

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

JOÃO CARLOS FOSSE FILHO

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE *Astronotus ocellatus*
E LARVAS DE *Oreochromis niloticus* COM SUPLEMENTAÇÃO DE
ENZIMAS EXÓGENAS**

Campos dos Goytacazes - RJ

2018

JOÃO CARLOS FOSSE FILHO

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE *Astronotus ocellatus* E
LARVAS DE *Oreochromis niloticus* COM SUPLEMENTAÇÃO DE
ENZIMAS EXÓGENAS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Orientador: Dalcio Ricardo de Andrade

Campos dos Goytacazes - RJ

2018

JOÃO CARLOS FOSSE FILHO

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE *Astronotus ocellatus* E
LARVAS DE *Oreochromis niloticus* COM SUPLEMENTAÇÃO DE
ENZIMAS EXÓGENAS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Aprovado em 22 de Junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Rafael Vieira Azevedo – INCAPER

Prof. Douglas da Cruz Mattos – IFES – Piúma

Prof. Manuel Vazquez Vidal Júnior – UENF

Prof. Dalcio Ricardo de Andrade - UENF
(Professor Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Ao meu pai, mãe, irmã e avó pela paciência e auxílio nas horas difíceis. Em especial ao meu pai por estar sempre pronto a me ouvir, me acalmar e me orientar a tomar sempre a melhor decisão. E a minha mãe pelo apoio incondicional e amor que está sempre disposta a me oferecer.

Ao professor e orientador Dr. Dalcio Ricardo de Andrade por todo o apoio, incentivo, paciência, ensinamentos e amizade. Agradeço também ao professor e co-orientador Manuel Vazquez Vidal Junior pelo incentivo, atenção, paciência, ensinamentos e convívio no laboratório.

Ao professor Dr. Leonardo Serafim da Silveira pela ajuda, disponibilidade e apoio prestado nesta pesquisa.

À todos os meus colegas de laboratório, os que concluíram sua formação e seguiram seus caminhos, aos que permaneceram até hoje e aos que chegaram recentemente. Agradeço pela convivência e espero que possamos continuar trabalhando juntos ainda por um longo tempo.

À todos os meus colegas de república.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

FOSSE FILHO, J. C. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Junho de 2018; Morfologia do trato digestivo e desempenho zootécnico de juvenis de *Astronotus ocellatus* e larvas de *Oreochromis niloticus* com suplementação de enzimas exógenas

O *Astronotus ocellatus* é uma espécie de peixe, nativo da Bacia Amazônica, com alto potencial para a aquicultura, tanto de corte como ornamental. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe da família *Cichlidae*, nativa do continente africano. No Brasil apenas seu cultivo representa metade da produção anual de peixes. Os trabalhos realizados foram divididos em três experimentos distintos. Os experimentos objetivaram testar níveis enzimáticos na nutrição de *Astronotus ocellatus* e *Oreochromis niloticus* sob diferentes condições de cultivo. No primeiro experimento (*Astronotus ocellatus*): Foram testados seis tratamentos com três repetições cada, um tratamento foi o controle (sem adição de complexo enzimático), e os outros receberam os níveis de 0,066%; 0,0132%; 0,0200%; 0,0266%; 0,032%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia no período de 45 dias. Os tratamentos controle e 0,0266% de inclusão foram os que apresentaram os melhores resultados para os parâmetros de desempenho. Não houve efeito significativo para os parâmetros morfométricos avaliados. Como conclusão, a inclusão de complexo enzimático não apresentou diferença nos resultados de parâmetros de desempenho ou morfométrico dos animais. O segundo experimento (*Astronotus ocellatus*): Foram testados cinco tratamentos com quatro repetições cada, um tratamento foi o controle (sem adição de complexo enzimático), e os outros receberam os níveis de 0,066%; 0,0132%; 0,0200%; e 0,0266%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia no período de 30 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho analisados. Para os parâmetros morfométricos, o tratamento com 0,0266% de complexo enzimático apresentou a melhor resposta. Como conclusão, a inclusão de complexo enzimático não apresentou diferença nos resultados de desempenho, mas houve uma melhora significativa na morfométrico dos animais a medida que aumentava os níveis de complexo enzimático. No terceiro experimento (*Oreochromis niloticus*): Foram testados cinco tratamentos com quatro repetições cada, um tratamento foi o

controle (sem adição de complexo enzimático), e os outros receberam os níveis de 0,066%; 0,0132%; 0,0200%; e 0,0266%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia no período de 30 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho analisados. Para os parâmetros morfométricos, o tratamento com 0,0200% de complexo enzimático apresentou a melhor resposta para altura das vilosidades. Como conclusão, a inclusão de complexo enzimático não apresentou diferença nos resultados de desempenho, mas houve uma melhora significativa na morfométrico dos animais.

Palavras-chave: Nutrição, Piscicultura, Ciclídeos

ABSTRACT

FOSSE FILHO, J. C. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Junho de 2018; Morphology of the digestive tract and zootechnical performance of juveniles of *Astronotus ocellatus* and *Oreochromis niloticus* larvae with supplementation of exogenous enzymes

Astronotus ocellatus is a species of fish, native to the Amazon Basin, with high potential for aquiculture, both cut and ornamental. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a species of fish in the Cichlidae family, native to Africa. In Brazil, its cultivation alone represents half of the annual fish production. The works were divided into three different experiments. The experiments aimed to test enzymatic levels in the nutrition of *Astronotus ocellatus* and *Oreochromis niloticus* under different culture conditions. In the first experiment (*Astronotus ocellatus*): Six treatments with three replicates were tested, one treatment was the control (without addition of enzymatic complex), and the others received levels of 0.066%; 0.0132%; 0.0200%; 0.0266%; 0.032%. The animals were fed four times a day within 45 days. Control and 0.0266% inclusion treatments presented the best results for the performance parameters. There was no significant effect on the morphometric parameters evaluated. As conclusion, the inclusion of enzymatic complex showed no difference in the results of performance or morphometric parameters of the animals. The second experiment (*Astronotus ocellatus*): Five treatments were tested with four replicates each, one treatment was the control (without addition of enzyme complex), and the others received levels of 0.066%; 0.0132%; 0.0200%; and 0.0266%. The animals were fed four times a day within 30 days. There was no significant difference between the treatments for the performance parameters analyzed. For the morphometric parameters, treatment with 0.0266% enzyme complex presented the best response. In conclusion, the inclusion of enzyme complex showed no difference in the performance results, but there was a significant improvement in the morphometric of the animals as the enzyme complex levels increased. In the third experiment (*Oreochromis niloticus*): Five treatments were tested with four replicates each, one treatment was the control (without addition of enzyme complex), and the others received levels of 0.066%; 0.0132%; 0.0200%; and 0.0266%. The animals were fed four times a day within 30 days. There was no significant difference between the treatments for the performance parameters analyzed. For the

morphometric parameters, treatment with 0.0200% of enzyme complex presented the best response for villus height. In conclusion, the inclusion of enzyme complex did not show any difference in the performance results, but there was a significant improvement in the morphometric of the animals.

Key-words: Nutrition, Fish farming, Ciclídeos

LISTA DE TABELA

Capítulo 1

Tabela 1	Níveis de garantia fornecido pelo fabricante da ração.....	40
Tabela 2	Comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (H), peso (P), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) de <i>Astronotus ocellatus</i>	43
Tabela 3	Índice hepatossomático (IHS), índice digestossomático (IDS), consumo de ração por peixe (CrPX), conversão alimentar (CAA), sobrevivência (SB%) de juvenis de <i>Astronotus ocellatus</i>	44
Tabela 4	Resultado dos parâmetros morfométricos.	44

Capítulo 2

Tabela 1	Composição base das rações experimentais.....	52
Tabela 2	Comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (H), peso (P), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) de <i>Astronotus ocellatus</i>	56
Tabela 3	Comprimento do intestino (Ci), índice hepatossomático (IHS), índice digestossomático (IDS), consumo de ração por peixe (CrPX), conversão alimentar (CAA), sobrevivência (SB%) de juvenis de <i>Astronotus ocellatus</i>	57
Tabela 4	Resultado dos parâmetros morfométricos.	57

Capítulo 3

Tabela 1	Composição base das rações experimentais.....	66
Tabela 2	Comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (H), peso (P), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) de <i>Oreochromis niloticus</i>	69
Tabela 3	Comprimento do intestino (Ci), índice hepatossomático (IHS), índice digestossomático (IDS), consumo de ração por peixe	

	(CrPX), conversão alimentar (CAA), sobrevivência (SB%) de <i>Oreochromis niloticus</i>	70
Tabela 4	Resultado dos parâmetros morfométricos.	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ESPÉCIE	16
2.1.1	Apaiari (<i>Astronotus ocellatus</i>)	16
2.1.2	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	17
2.2	ESTRUTURA DO SISTEMA DIGESTÓRIO	17
2.2.1	Cavidade bucal e faringe	19
2.2.2	Esôfago	20
2.2.3	Estômago	21
2.2.4	Intestino	22
2.3	ENZIMAS DIGESTIVAS	23
2.3.1	Amilases	25
2.3.2	Proteases	26
2.3.3	Lipases	27
2.4	ENZIMAS EXÓGENAS	27
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4	ARTIGO 1 - DESEMPENHO E MORFOMETRIA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE <i>Astronotus ocellatus</i> ALIMENTADOS COM RAÇÃO COMERCIAL SUPLEMENTADA COM COMPLEXO ENZIMÁTICO	38
	RESUMO	38
	ABSTRACT	38
	INTRODUÇÃO	39
	MATERIAL E MÉTODOS	40
	Ambiente experimental	40
	Desenho experimental	41
	Biometria	42
	Análises histológicas	43
	Análises estatísticas	44

	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
5	ARTIGO 2 - EFEITO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO <i>Allzyme</i>® SSF NA NUTRIÇÃO E MORFOMETRIA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE <i>Astronotus ocellatus</i>	50
	RESUMO	50
	ABSTRACT	50
	INTRODUÇÃO	51
	MATERIAL E MÉTODOS	52
	Ambiente experimental	52
	Desenho experimental	53
	Biometria	54
	Análises histológicas	55
	Análises estatísticas	56
	RESULTADOS	56
	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
6	ARTIGO 3 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ENZIMAS EXÓGENAS NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA FARINHA DE PEIXES POR FARELO DE SOJA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE LARVAS DE <i>Oreochromis niloticus</i>	63
	RESUMO	63
	ABSTRACT	63
	INTRODUÇÃO	64
	MATERIAL E MÉTODOS	65
	Ambiente experimental	65
	Desenho experimental	66
	Biometria	67
	Análises histológicas	68
	Análises estatísticas	69

RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

O *Astronotus ocellatus*, popularmente conhecido como apaiari ou oscar, é um peixe da Família Cichlidae, nativo da Bacia Amazônica. Esta espécie tem grande potencial para a piscicultura comercial devido a sua carne firme, saborosa e ausência de espinhas intramusculares (FONTENELE e NEPOMUCENO, 1983) com boa aceitação, pois nas décadas de 70 e 80, foi produzido em grande escala no nordeste brasileiro (BEZERRA e SILVA et al., 1993). Além disso, seu comportamento agressivo e coloração atraente fazem com que a espécie apresente atrativos para a aquariofilia, com exemplares cultivados no mundo todo para esta finalidade (FONTENELE, 1982).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixes da família Cichlidae, nativa do continente asiático. No Brasil, apenas seu cultivo representa metade da produção anual de peixes. Esse destaque se deve a sua resistência a níveis baixos de oxigênio dissolvido e altos de amônia na água, crescimento rápido, boa conversão alimentar e boa aceitação de alimentos artificiais desde a fase larval (MEURER et al., 2000).

Na área da nutrição animal, as pesquisas têm sido realizadas visando alternativas na formulação da dieta, de modo a desenvolver rações mais eficientes e economicamente viáveis, visto que a ração na piscicultura representa a maior parcela no custo total de produção.

O trato digestório das larvas de muitas espécies de peixes sofre inúmeras alterações no decorrer de seu desenvolvimento ontogênico, o que pode influenciar diretamente em sua sobrevivência e desempenho zootécnico sob condições de cultivo. Estas alterações estão relacionadas com a morfologia e a capacidade da larva de produzir enzimas digestivas necessárias para a digestão e absorção dos nutrientes. Assim, o conhecimento sobre o desenvolvimento estrutural do sistema digestório é essencial para compreender a fisiologia digestiva e determinar o tempo ideal para alterações na dieta das larvas (CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; KAMACI et al., 2009).

O tempo de desenvolvimento do trato digestório e de suas funções fisiológicas é afetado pelo histórico de vida e estratégia reprodutiva de cada espécie (BALON, 1975). Além disso, esse tempo pode sofrer alterações por fatores abióticos

e bióticos como, temperatura, disponibilidade e qualidade do alimento, e qualidade de água (ZAMBONINO-INFANTE e CAHU, 2007).

Aspectos da organização histológica do trato digestório durante a ontogenia inicial ou sob diferentes condições alimentares podem ser considerados como valioso biomarcador para acessar as condições nutricionais e avaliar o efeito de dietas desbalanceadas em larvas e juvenis (GISBERT et al., 2008). Nesse sentido, Treviño et al. (2011) relataram que o intestino e o fígado são considerados bons alvos de estudo, já que suas organizações histológicas são particularmente sensíveis à quantidade e a qualidade da dieta.

Estudos com suplementação de enzimas exógenas em larvas e juvenis de peixes têm apresentado resultados distintos em relação a sua eficiência. Kolkovski (2001) concluiu que o efeito das enzimas digestivas nas dietas é dependente da idade, espécie e do tipo de enzima digestiva, bem como, do hábito alimentar da espécie. O efeito da adição de enzimas digestivas na ração tem sido estudado para algumas espécies de peixes continentais, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (TESSER et al., 2006) e tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (SIGNOR et al., 2010). Entretanto, o *A. ocellatus* ainda requer estudos com objetivo de obter o melhor aproveitamento de dietas microparticuladas e, conseqüentemente, melhor desempenho zootécnico em sistemas de cultivo intensivo.

Os grãos de soja possuem quantidades elevadas de substâncias pécticas na parede celular (COSTA et al., 2004). Segundo Ouhida et al. (2002), o tratamento de cascas e cotilédones de soja com enzimas degradadoras de parede celular (pectinase, xilanase e celulase) resulta na liberação de, pelo menos, 7% dos monossacarídeos componentes das frações não solúveis em água.

Os complexos enzimáticos não apresentam função nutricional direta, mas, atuam como auxiliador no processo digestivo, de modo a melhorar a digestibilidade dos nutrientes. A atuação das enzimas exógenas ocorre da mesma forma que as enzimas endógenas, apresentando um sítio ativo com a capacidade de atuar sobre substratos específicos, hidrolisando-os (COSTA et al., 2007).

O uso de subprodutos vegetais na alimentação de peixes é economicamente viável devido sua ampla disponibilidade e, conseqüentemente, menor custo. Os usos de enzimas exógenas nas rações de peixes são excelentes alternativas para melhorar a digestibilidade do farelo de soja e reduzir os custos com farinha de peixes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPÉCIE

2.1.1 **Apaiari** (*Astronotus ocellatus*)

O *A. ocellatus* é um ciclídeo originário da Bacia Amazônica, adaptado e disseminado desde 1938 em açudes e rios do Nordeste brasileiro pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), encontrado em quase todo o país (FONTENELE, 1982).

Quanto ao comportamento da espécie, Braga (1962) afirma que é preferencialmente gregário: alevinos e juvenis nadam em cardumes compactos e adultos são territorialistas. Preferem locais sombreados e calmos e águas rasas e claras. Não são tolerantes a grandes variações de temperatura, uma vez que, sua atividade é reduzida em águas abaixo de 15°C e morre quando a temperatura se torna inferior a 10°C.

O apaiari apresenta corpo de conformação robusta, achatado lateralmente, relativamente alto em relação ao comprimento, região dorsal espessa e sem espinhas intramusculares, cor parda escura ou castanha, com manchas verticais vermelho-claras, nadadeira dorsal e anal com espinhos, nadadeira caudal arredondada, cabeça pequena em relação ao corpo, olhos grandes e linha lateral interrompida. Uma das características desta espécie é um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira de mesmo nome (FONTENELE e NEPOMUCENO, 1983).

Gurgel e Freitas (1973) afirmam que o aproveitamento do apaiari com peso médio de 283,8 gramas é, em média, de 85,5%, entre o peixe íntegro e eviscerado, variando de 81 a 90,6%. As fêmeas apresentam maior rendimento em carne do que os machos.

Nos anos de 1978 a 1988, a produção de acará-açu (apaiari), em 100 açudes administrados pelo DNOCS, foi de 5.574,34 toneladas, em média 506,76 toneladas por ano, o que colocou a espécie entre as seis mais produtivas, sua produção de alevinos é promissora e viável, com mão de obra, relativamente baixa sem comprometer os rendimentos (BEZERRA e SILVA et al., 1993).

2.1.2 Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), é uma espécie nativa da bacia do rio Nilo, no Leste da África, pertence à família dos ciclídeos, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais (CARVALHO, 2006). No Brasil foi introduzida, em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994; CASTAGNOLLI, 1996).

O hábito alimentar onívoro da tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) há torna uma espécie bastante versátil, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao sistema de criação em tanques-rede com rações completas e com alta tecnologia de produção (MEURER et al., 2002). Com boa aceitação no mercado consumidor, devido a ótima qualidade de carne, e por não apresentar espinhos intramusculares no seu filé, destaca-se no cultivo, por apresentar crescimento rápido e rusticidade (HILDSORF, 1995).

Os peixes onívoros possuem adaptações morfológicas e fisiológicas que possibilitam a utilização de rações com elevadas porcentagens de ingredientes vegetais, pois utilizam melhor os carboidratos e a proteína dessas fontes (TENGGJAROENKUL et al., 2000), em relação aos carnívoros. Isso possibilita redução no custo com a alimentação (DEGANI et al., 1997), principalmente com as tilápias (DEGANI e REVACH, 1991), que se destacam entre as espécies onívoras na utilização dos aminoácidos das fontes protéicas convencionais e alternativas de origem vegetal (FAGBENRO, 1998).

2.2 ESTRUTURA DO SISTEMA DIGESTÓRIO

No momento da eclosão, muitas larvas de peixes apresentam órgãos imaturos e, com isso, sua nutrição é provida endogenamente através do saco vitelino (YUFERA e DARIAS, 2007). Os principais órgãos tornam-se funcionais até o momento de primeira alimentação, e diferenciam-se durante o estágio larval e metamorfose (FALK-PETERSEN, 2005).

De acordo com características morfológicas e histológicas dos órgãos digestivos, alguns autores fizeram uma caracterização geral do desenvolvimento e diferenciação do sistema digestivo através de sua divisão em três diferentes fases:

um período intenso de proliferação celular e morfogênese dos órgãos digestivos, um período no qual as estruturas digestivas se diferenciam e alcançam suas definitivas organizações morfológicas e histológicas e finalmente, um estágio caracterizado pelo crescimento em tamanho e volume dos órgãos digestivos (TREVIÑO et al., 2011; COMABELLA et al., 2013). Entretanto, o tempo de desenvolvimento de cada órgão e de suas funções fisiológicas é afetado pela história geral de vida e estratégia reprodutiva de cada espécie e também por uma variedade de fatores bióticos e abióticos, incluindo qualidade de água, temperatura e disponibilidade e composição do alimento (PRADHAN et al., 2012).

Nos vertebrados, diferentes segmentos do trato gastrintestinal empregam diferentes mecanismos celulares em resposta à quantidade e qualidade da dieta. A utilização do intestino e das glândulas acessórias digestivas como órgãos alvo do estado nutricional e fisiológico no peixe é bem conhecida. O intestino está envolvido em importantes funções fisiológicas digestivas, sendo o principal local de digestão e absorção dos alimentos, enquanto o fígado é o órgão metabólico central do corpo com um papel predominante no metabolismo intermediário, com funções importantes no armazenamento e digestão de lipídios, além de processos de desintoxicação. A utilização ótima dos nutrientes da dieta em última análise depende da eficácia das funções no intestino e no fígado e, conseqüentemente, a alteração estrutural da organização histomorfológica desses órgãos pode fornecer informações úteis sobre a qualidade da dieta, metabolismo e do estado nutricional dos peixes. Além dos órgãos-alvo acima mencionados, vários estudos têm usado satisfatoriamente outros tecidos, como o músculo e cartilagem, como indicadores do estado nutricional das larvas de peixes em jejum (CATALAN e OLIVAR, 2002).

Treviño et al. (2011) estudaram e compararam a ontogenia do sistema digestório de larvas de *Petenia splendida* com outras espécies de águas continentais e, através de seus resultados, observaram que o desenvolvimento histológico do trato digestivo e de glândulas acessórias da espécie estudada pelos autores foi similar aos achados em outros estudos anteriores, exceto pelo tempo de desenvolvimento dos eventos e duração dos estágios ontogênicos. Nesse sentido, Lazo et al. (2011) relataram que, para a maioria das espécies descritas, no momento da eclosão o canal alimentar é composto por um tubo estreito indiferenciado localizado dorsalmente ao saco vitelino. Contudo, durante o estágio larval lecitotrófico, as larvas sofrem rápidas mudanças no desenvolvimento levando

a diferenciação de diversas regiões e órgãos componentes do sistema digestivo, a saber, bucofaringe, esôfago, intestino, pâncreas e fígado, ao passo que a morfogênese do estômago é dependente da espécie.

Os fatores anatômicos relacionados ao início da alimentação exógena são aqueles relacionados com a localização da presa (olhos e órgãos quimiosensoriais), captura (boca, cauda e músculos), ingestão e digestão (sistema digestivo) (YÚFERA e DARIAS, 2007). No momento da eclosão, quando as larvas da maioria das espécies dispõem ainda das reservas vitelínicas, o trato digestivo aparece como um tubo reto indiferenciado localizado dorsalmente ao saco vitelino, ainda sem comunicação com o ambiente externo, já que, nesta fase, ainda não há desenvolvimento completo de boca e ânus (MAI et al., 2005). Segundo Gisbert et al. (2004), durante a absorção do saco vitelino de larvas de *Paralichthys californicus*, o sistema digestivo sofre mais alterações e o tubo digestivo indiferenciado torna-se segmentado em três regiões histológicas diferentes: a bucofaringe, esôfago e intestino.

2.2.1 Cavidade bucal e faringe

No momento da eclosão, a bucofaringe das larvas de *Acipenser baeri* se apresenta fechada. Esta é inicialmente revestida por duas a três células ao longo do epitélio cúbico pseudoestratificado, cercado por tecido conectivo e lamina própria (GISBERT et al., 1998). Em *Oplegnathus fasciatus*, no momento da abertura de boca, a cavidade bucal e válvula oral são compostas de um epitélio escamoso simples (HE et al., 2012). Células caliciformes aparecem na mucosa bucofaringiana posterior com 7-9 dias após eclosão (DAE) em *Paralichthys californicus*. Entre 10 e 11 DAE, as células caliciformes aumentaram numericamente e começaram a secreção de glicoproteínas neutras, e em 13 DAE, as mesmas sintetizaram ácido (carboxilado e sulfatado) mucinas contendo resíduos de ácidos siálico. Ainda nesta idade, dentes caninos foram observados surgindo da válvula oral e na região posterior da cavidade bucofaringeana. Ao final do estágio de pré-flexão (15-17 DAE), células caliciformes e papilas gustativas foram visíveis por todo o epitélio bucofaringeano sendo mais abundante na região anterior da cavidade bucal (GISBERT et al., 2004). O mesmo ocorreu em *Atractosteus tristoechus* (COMABELLA et al., 2013), *Oponk bimaculatus* (PRADHAM et al., 2012) e *Seriola*

lalandi (CHEN et al., 2006), porém, em diferentes idades de desenvolvimento. O surgimento das papilas gustativas, dentes e células caliciformes na bucofaringe podem indicar que a larva adquire a capacidade de avaliação da palatabilidade e o reflexo de deglutição do alimento (MICALE et al. 2006). Segundo Pradhan et al. (2012), o tempo de desenvolvimento dos dentes, língua, papilas gustativas e células mucosas na bucofaringe de *O. bimaculatus* coincidiram com a transição da larva do alimento endógeno para o exógeno, que pode ser atribuído ao envolvimento das estruturas mencionadas anteriormente na captura, gosto e deglutição da presa. Além disso, a abundância de células caliciformes na região posterior da bucofaringe e esôfago e suas secreções ricas em glicoconjugados neutros podem servir como um lubrificante protegendo a mucosa da bucofaringe e do esôfago de abrasões que podem ser causadas pelo alimento vivo (GISBERT et al., 1999).

2.2.2 Esôfago

Na eclosão, o esôfago em larvas de peixes não é uma região do trato digestório diferenciada morfológicamente e sua morfogênese tem lugar no último estágio de desenvolvimento, apenas antes do início da alimentação exógena (LAZO et al., 2011). Segundo Gisbert et al. (1998), o esôfago em *Acipenser baeri* começa a se diferenciar com três DAE, esta estrutura aparece ainda como um epitélio colunar simples com um estreito e curto lúmen. Ainda este autor relata um grande número de células esofágicas apresentando vacúolos supranucleares com inclusões de vitelo acidófilo e grânulos de pigmento. Nesta idade, secções histológicas revelam que o esôfago está em morfogênese e suas conexões com o futuro estômago ainda não estão estabelecidas devido a grande massa de vitelo ainda presente.

No momento da primeira alimentação exógena em larvas de *Seriola lalandi*, não foram observadas células mucosas nem vilosidades. Contudo, dois dias após o início da alimentação exógena, ambas as estruturas iniciaram sua formação e rapidamente aumentaram em número. As células mucosas foram coradas em vermelho pela técnica de PAS com 12 DAE, indicando a presença de glicoproteínas neutras ou mucosubstâncias. Já as vilosidades são formadas por um epitélio cúbico simples. Com 15 DAE, quando o alimento das larvas mudou de rotíferos para náuplios de artêmia, a quantidade de células mucosas e vilosidades são

abundantes e nenhuma mudança histológica substancial é encontrada deste momento até 36 DAE (CHEN et al., 2006).

Segundo Comabella et al. (2013), em um estudo com larvas de *Atractosteus tristoechus*, a conexão entre o esôfago e o estômago cárdico ocorre com quatro DAE. Neste momento, o esôfago é alongado, e duas regiões associadas com secreção (anterior) e transporte do alimento (posterior) podem ser distinguidas com abundantes células caliciformes e ciliadas. As células caliciformes e a mucosa do esôfago são intensamente coradas pela técnica de PAS indicando secreções de mucopolissacarídeos. A região anterior do esôfago foi revestida por um epitélio colunar pseudoestratificado. Já a região posterior, que conecta o esôfago com o estômago cárdico, consistiu de um epitélio colunar ciliado simples. Diversas vilosidades longitudinais foram presentes na junção entre o esôfago posterior e o estômago cárdico. Estas vilosidades aumentam em complexidade e comprimento com o desenvolvimento larval. Ainda estes autores relatam que a abertura de boca e ânus das larvas desta espécie ocorre com três DAE, mas como a conexão entre esôfago e estômago ainda não se encontrava formada, a assimilação de alimento era impossível. Uma especial atenção pode ser necessária em tanques durante os primeiros dias de larvicultura, imediatamente antes ao aparecimento das células caliciformes esofágicas funcionais, uma vez que a ingestão do alimento vivo pode resultar em descamações e abrasões do epitélio esofágico devido à ausência da mucosa protegendo esta área, assim, podendo resultar em uma alta mortalidade larval (GISBERT et al., 2004).

2.2.3 Estômago

Embora em muitas espécies um estômago incipiente é distinto logo após a eclosão, na transição entre o esôfago e o intestino, o estômago é um dos últimos órgãos do sistema digestivo a se diferenciar (ZAMBONINO INFANTE et al., 2008). Em *Petenia splendida*, a diferenciação deste órgão acontece com 6 DAE, este evento ocorre na região posterior ao esôfago através da ampliação do trato digestivo (TREVIÑO et al., 2011). Após a dilatação do trato digestivo a mucosa do estômago torna-se pregueada, enquanto uma camada circular fina de células musculares rodeia a mucosa. Este evento é seguido, posteriormente, pela detecção do esfíncter pilórico primordial (que separa o estômago do intestino anterior), a

modificação do músculo circular (que se torna estriado) e a observação das células sanguíneas e do tecido conectivo frouxo (HE et al., 2012). Em seguida, se inicia a segmentação do estômago em diferentes regiões estruturais, tais como cárdica, fúndica e pilórica, que são distintas por um epitélio colunar espesso (SARASQUETE et al., 2014). Neste momento, as glândulas gástricas são primeiramente evidenciadas, concentradas em ambas regiões cárdica e fúndica, ou como relatado por Pradhan et al. (2012), região glandular. A mucosa da região cárdica do estômago é organizada em pregas, revestida por um curto epitélio ciliado simples com núcleos basais e desprovida de células caliciformes. Já a região fúndica foi revestida por um alto epitélio colunar ciliado simples com células caliciformes acidofílicas. A região pilórica do estômago foi pregueada e revestida por um curto epitélio colunar ciliado e com ausência de glândulas gástricas (MAI et al., 2005).

O estômago é geralmente estimado como completamente desenvolvido quando as glândulas gástricas são presentes, e as regiões descritas anteriormente são distinguidas (ZAMBONINO INFANTE et al., 2008). Em adição, Pradhan et al. (2012) citaram que a presença de células mucosas no epitélio revestindo o lume do estômago, produzindo e secretando glicoconjugados neutros confirmou que, o estômago provavelmente se apresentava funcional em *Ompok bimaculatus*, já que, muco-substâncias neutras podem proteger o estômago da autodigestão causado pelo ácido clorídrico (HCl) e enzimas produzidas pelas glândulas gástricas durante o processo de digestão do alimento ingerido.

2.2.4 Intestino

O intestino é a mais longa porção do trato digestório, ocupa a maior parte da cavidade abdominal, e é um dos primeiros órgãos digestivos a se diferenciar. A mucosa intestinal é um tecido muito dinâmico e ativo e é o principal sitio de digestão e absorção dos nutrientes, bem como sendo diretamente envolvido na ativação hormonal e nervosa da síntese de enzimas e bile e suas subseqüentes secreções do pâncreas e fígado. Larvas recém eclodidas possuem um intestino primordial revestido por um epitélio colunar simples em diferenciação (LAZO et al., 2011). A segmentação intestinal é aparente em larvas de *Chelon labrosus* desde que a futura válvula íleo-retal se torna desenvolvida e claramente separa o intestino anterior (pré-valvular) da porção intestinal posterior (pós-valvular) (SARASQUETE et al.,

2014). Segundo Lazo et al. (2011), não são observadas diferenças histológicas entre o intestino pré- e pós-valvular; ambas regiões são revestidas por um epitélio colunar simples com núcleo basal, citoplasma basófilo e microvilosidades proeminente.

Durante o desenvolvimento larval, o intestino dos peixes se enrola e forma um circuito fechado para acomodar seu aumento de tamanho na cavidade visceral, as vilosidades intestinais aumentam e as células calciformes se diferenciam no epitélio (HERNÁNDEZ et al., 2014). Três regiões distintas podem ser distinguidas ao longo do intestino de acordo com suas organizações histológicas. O segmento antero-mediano (pré-valvular intestino) recebe as secreções pancreáticas e biliares e é histologicamente caracterizado por um epitélio colunar com microvilosidades proeminentes e com um alto número de células calciformes, muito próximas ao esfíncter pilórico (ZAMBONINO INFANTE et al., 2008). Esta região do intestino é o principal sitio do trato digestivo para absorção de lipídeos (DIAZ et al., 1997; OLSEN et al., 2000), enquanto as proteínas são absorvidas no intestino posterior (DEPLANO et al., 1991). Contudo, outros estudos têm reportado que digestão e absorção lipídica continuam nas porções posterior e retal do intestino (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2001; GISBERT et al., 2005).

2.3 ENZIMAS DIGESTIVAS

Um dos primeiros e particularmente importantes experimentos com enzimas foi o isolamento do complexo enzimático do malte, por Payen e Persoz, em 1833. A origem do termo “enzima” se deu quando, em 1876, William Kuhne propôs que ele fosse adotado como uma nova forma de designar fenômenos previamente conhecidos como “fermentações organizadas”, que eram, o isolamento de fermentos de organismos viáveis, a partir dos quais eram formadas as enzimas. A palavra significa “*in yeast*” e é derivada do grego “*em*”, que significa “*in*” e “*zime*”, significa “*yeast*” ou “*leaven*” (FOX, 1991).

As enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, possibilitando e ou aumentando a velocidade das reações químicas no organismo (CHAMPE e HARVEY, 1989). A estrutura molecular das enzimas é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser

desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (GRAHAM e INBORR, 1991).

Os processos de digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes dependem da presença e disponibilidade de enzimas digestivas adequadas em locais apropriados ao longo do trato gastrointestinal (MORAES e ALMEIDA, 2014). Na maioria dos peixes, a maior parte da digestão ocorre no intestino (ROTTA, 2003), porém, o estômago, a mucosa intestinal, o pâncreas e os cecos pilóricos (quando presentes) também são fontes de enzimas. Geralmente, a distribuição e a atividade das enzimas variam em função do hábito alimentar e da morfologia do trato digestório (CHAKRABARTI e RATHORE, 2010; LIN et al., 2010). As enzimas digestivas são indutivas, assim, as maiores quantidades de carboidratases são encontradas nos herbívoros e, conseqüentemente, os maiores níveis de atividade proteolítica são encontrados nas espécies de hábito alimentar carnívoro (HIDALGO et al., 1999).

Os peixes possuem capacidade de modular seu perfil digestivo mediante diferentes fontes, tipos e quantidades de nutrientes na dieta, sendo esta uma característica adaptativa desejável as atividades de piscicultura (CORRÊA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2006). Contudo, essa habilidade parece variar de acordo com a espécie. Os peixes carnívoros, por exemplo, parecem ter limitadas habilidades de alterar suas funções digestivas e de transporte de nutrientes de acordo com a composição da dieta, enquanto os onívoros exibem uma habilidade muito maior em modular sua fisiologia digestiva e absorção (BUDDINGTON et al., 1997). Considerando-se o caráter indutivo das enzimas digestivas, a flexibilidade das espécies pode permitir não só os ajustes necessários ao ótimo aproveitamento dos nutrientes da dieta, mas também explorar a capacidade adaptativa dos peixes frente a fontes alternativas de energia metabólica (SILVA, 2008).

De maneira geral, as enzimas presentes no trato digestório podem ser classificadas de acordo com seu papel catalítico na digestão de proteínas, carboidratos e lipídios. Se considerar o peso molecular e ou a complexidade destes substratos, seu processo digestivo é composto por um conjunto de enzimas que têm funções complementares (MORAES e ALMEIDA, 2014).

As pesquisas têm mostrado uma ampla convergência entre as atividades digestivas nos peixes teleósteos adultos (BARRINGTON, 1957) e as existentes nos vertebrados superiores, o que sugere que o equipamento enzimático é, em grande

parte, análogo. As diferentes células glandulares do estômago secretam proteases (pepsina) e ácido clorídrico (NOAILLAC-DEPEYRE e GÁS, 1978), sendo a pepsina dos peixes considerada análoga à dos mamíferos.

A digestão no intestino ocorre devido à ação de distintos produtos secretados pela parede intestinal e também por glândulas anexas (pâncreas e fígado). O pâncreas lança no intestino enzimas digestivas diversas: proteases, carboidrases e lipases (HIDALGO e ALLIOT, 1987).

Nos mamíferos, a amilase é produzida por células salivares ou pancreáticas, enquanto a única fonte de α -amilase em peixes parece ser o pâncreas exócrino, visto que os mesmos não possuem glândulas salivares. Alta atividade de amilase ocorre no fígado e bile de algumas espécies de carpa e goldfish que possuem hepatopâncreas (KROGDAHL et al., 2005).

2.3.1 Amilases

A digestão de carboidratos em peixes ocorre no estômago, nos cecos pilóricos e no intestino pela hidrólise de moléculas de polissacarídeos complexas (WILSON e POE, 1985). A digestão de carboidratos é realizada por algumas enzimas, sendo a amilase a mais relevante produzindo uma variedade de oligossacarídeos e monossacarídeos como produtos da reação (LOVELL, 1989). A utilização dos carboidratos difere entre as espécies e depende principalmente da complexidade da fonte de carboidrato ingerida (YAMAMOTO et al., 2000). O amido é a forma de armazenamento para a glicose nos vegetais, sendo constituído por uma mistura de amilose (amido não ramificado) e amilopectina (amido ramificado). A estrutura do glicogênio é similar ao da amilopectina, com maior número de ramificações, sendo a forma de armazenamento de glicose nos animais. A α -amilase catalisa a hidrólise das ligações α -1,4 da amilose, amilopectina e glicogênio, liberando maltose e isomaltose e não é capaz de hidrolisar as ligações α -1,6 (STRYER et al., 2004).

Amilase é uma enzima da classe das hidrolases que catalisa reações que implicam na ruptura das ligações glicosídicas pela adição de uma molécula de água. A amilase rompe ligações glicosídicas do tipo α -1,4 presentes nas moléculas de amido e glicogênio e possui pH ótimo em torno de 7,0 (YOON e ROBYT, 2003; STRYER et al., 2004).

A amilase é uma das enzimas digestivas, de origem pancreática, que age no intestino delgado sobre os polissacarídeos presentes no quimo. Embora os carboidratos constituam um dos três principais componentes das dietas de animais utilizados como fontes de energia para crescimento, as funções biológicas e a metabolização desse nutriente em peixes ainda não estão totalmente entendidas (CAMILO, 2007). A habilidade de adaptar a secreção da amilase para o nível de carboidrato da dieta e a tomada de alimento deve ser restrita aos peixes onívoros e herbívoros (KROGDAHL et al., 2005). O aumento na produção de amilase pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos ou de produtos de sua hidrólise no trato gastrointestinal. A glicose pode influenciar diretamente sua produção pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas (JOBBLING, 1994).

2.3.2 Proteases

A proteína é o nutriente que se apresenta em maior quantidade em dietas para larvas, portanto, um grande número de estudos tem sido orientados para a caracterização da atividade das proteases (HOFER, 1981; DIMES et al., 1994; MUNILLA-MORAN e SABORIDO-REY, 1996; HIDALGO et al., 1999; FERNÁNDEZ et al., 2000). As proteases são classificadas em proteinases (endopeptidases) e exopeptidases, dependendo do sítio de ação. Quando a hidrólise ocorre nas ligações peptídicas localizadas no centro da cadeia polipeptídica (proteína), as proteases são do tipo proteinases, e atuando nas ligações peptídicas de resíduos de aminoácidos terminais (extremidades) são do tipo exopeptidases (GARCÍA-CARREÑO e NAVARRETE, 1997). As proteinases mais importantes são a pepsina (EC 3.4.23.1), secretada pelas glândulas gástricas como zimogênio, agindo no estômago em pH ácido, a tripsina (Ec 3.4.21.4) e a quimotripsina (EC 3.4.21.1), ambas de origem pancreática sintetizadas como zimogênios, agindo no intestino em pH alcalino. Os zimogênios são enzimas inativas que são ativadas quando um segmento da sua cadeia protéica é removido, o que é feito por outras enzimas proteolíticas específicas ativas. As proteases são sintetizadas e mantidas em forma inativa para evitar que exerçam atividade sobre as proteínas das membranas celulares e intracelulares do próprio organismo (SILVA e ANDERSON, 1995;

GARCÍA-CARREÑO e NAVARRETE, 1997; LOVELL, 1998; NELSON e COX, 2000).

A digestão de proteínas começa pela ação da pepsina no estômago, sendo completada pela ação de proteases alcalinas, como tripsina e quimiotripsina, no intestino. A atividade de protease ácida é mais concentrada no estômago, ocorrendo devido à ativação, em meio ácido, do pepsinogênio em pepsina. Outras proteases atuam também em pH alcalino após serem ativadas por tripsina, a qual é ativada através da enteroquinase, enzima secretada por células intestinais. Estas enzimas encontradas no trato gastrointestinal são muitas vezes complementares e levam à total digestão dos nutrientes da dieta permitindo sua completa absorção (STRYER et al., 2004; CAMILO, 2007). Já em peixes agástricos, como a carpa (*Cyprinus carpio sp*), as proteases e peptidases pancreáticas parecem ser as únicas responsáveis pela degradação de proteína, que estaria caracterizada pela ausência de proteólises em meio ácido (HIDALGO e ALLIOT, 1987).

2.3.3 Lipases

Os lipídios sofrem ação dos sais biliares produzidos pelo fígado. Esses sais têm ação detergente sobre os lipídios, fazendo com que os mesmos sejam separados em pequenos glóbulos de gordura, chamados de micelas. A formação de micelas permite a emulsificação ou solubilização dos produtos da digestão dos lipídios no quimo presentes no intestino, facilitando a ação das enzimas (BALDISSEROTTO, 2013).

A absorção intestinal de lipídeos é aparente durante o desenvolvimento de larvas pela presença de dois tipos de inclusão de lipídeos no enterócito. A primeira são partículas cujas dimensões e localizações no retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi apresenta que elas são lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) lipoproteínas (20-70 nm) ou quilomicrons (70-500 nm). O segundo são glóbulos de material amorfo – provavelmente triglicerídeos – que podem ser de até 6 µm de diâmetro (DIAZ et al., 2002).

A digestão dos lipídeos ocorre no estômago, nos cecos e no intestino pela ação de uma variedade de lipases e colipases. Os lipídeos das dietas, principalmente na forma de triacilgliceróis, é hidrolisado por lipases inespecíficas em ácido graxos livres e glicerol (SILVA e ANDERSON, 1995), que são absorvidos e

usados para processos biossintéticos de vários componentes celulares ou então catabolizados para obtenção de energia. Para a hidrólise de lipídeos, a lipase pancreática é secretada no lume intestinal e ativada pelos sais biliares. Subsequentemente, o intestino pode absorver as substâncias resultantes (LAZO et al., 2011).

2.4 ENZIMAS EXÓGENAS

As enzimas comercialmente produzidas são provenientes, geralmente, de bactérias do gênero *Bacillus sp*, fungos do gênero *Aspergillus sp* e leveduras (FIREMAN e FIREMAN, 1998), portanto, os microrganismos são a principal fonte de enzimas exógenas produzidas industrialmente por laboratórios especializados, por meio de culturas aeróbias, sendo derivadas da fermentação.

No mercado, existem três grupos de enzimas disponíveis: enzimas para alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja), enzimas para alimento de alta viscosidade (trigo, centeio, cevada, aveia, triticale e farelo de arroz) e enzima para degradar o ácido fítico dos grãos vegetais (melhora a utilização do fósforo dos vegetais) (ZANELLA et al., 1999). Para dietas à base de cereais de alta viscosidade, os complexos enzimáticos, na maioria das vezes, são compostos pelas enzimas glucanase, amilase, xilanase, celulase e hemicelulases, enquanto os compostos por amilase, protease e xilanases são usados nas dietas de baixa viscosidade.

Os principais fatores de atuação que as enzimas exógenas digestivas apresentam são: provocam a ruptura das paredes celulares das fibras; reduzem a viscosidade, devido à fibra solúvel na digesta do intestino proximal; degradam as proteínas, por exemplo, do farelo de soja; reduzindo os efeitos dos fatores antinutricionais tais como os inibidores de protease, tornando-os mais disponíveis ao animal; suplementam a produção de enzimas endógenas do animal (proteases, amilases e outras) e cuja ação é mais importante em animais jovens (SOTO-SALANOVA, 1996); manipulam as populações da microflora (BEDFORD e MORGAN, 1996) e disponibilizam enzimas que os animais não podem sintetizar (celulases, hemicelulases, xilanases, fitases, B-glucanases, pentosanases e outras) (PENZ JÚNIOR, 1998).

Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas, auxiliam o processo digestivo, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta

(HENN, 2002). As enzimas digestivas exógenas atuam da mesma forma que as endógenas, apresentando um sítio ativo com a capacidade de atuar sobre um substrato específico, hidrolisando-o (HENN, 2002).

As enzimas são adicionadas nas rações para não ruminantes com o objetivo de remover ou diminuir fatores antinutricionais dos alimentos (como os polissacarídeos não amiláceos), aumentando a digestibilidade das rações, reduzindo a viscosidade dos alimentos, auxiliando a atividade das enzimas endógenas e atuando em substratos que não são degradados por enzimas endógenas, como a celulose (CLEOPHAS et al., 1995).

O uso combinado de enzimas exógenas na forma de complexos enzimáticos possui maior comercialização no mercado agropecuário, visto que, as rações são formuladas com diversos ingredientes que por sua vez apresentam composição variável e necessitam de enzimas diversas para degradar seus compostos (CAMPESTRINI et al., 2005).

3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALCÂNTARA FILHO, P.; ARAÚJO FILHO, J.B. Análise quantitativa em um ensaio de piscicultura com o apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* (Cuvier) (Pisces, Perciformes, Cichlidae), na estação de piscicultura “Valdemar Carneiro de França” (Ceará-Brasil). **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 14, n.1/2, p. 15-35. 1983.

ALMEIDA, L.C.; LUNDSTEDT, L.M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 443-450, 2006.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3ª Ed., Santa Maria, UFSM, p. 352, 2013.

BALON, E.K. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 6, p. 1663-1670, 1975.

BARRINGTON, E.J.W. The alimentary canal and digestion. In: BROWN, M.E. (Ed.). **The Physiology of Fishes**, New York: Academic Press, v. 1, p. 149-150, 1957.

BEDFORD, M. R.; MORGAN, A. J. The use of enzymes in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, Wallingford, v. 52, n. 1, p. 61-68, Mar. 1996.

BEZERRA e SILVA, J.W.; REGIS, R.C.; BEZERRA, A.T. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, n. 1-2, p. 22-26, 1993.

BOLASINA, S.; PÉREZ, A.; YAMASHITA, Y. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2, p. 503-515, 2006.

BRAGA, R.A. Apaiari ou acará-açu, *Astronotus ocellatus ocellatus* Spix. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, 2p., 1962.

BREMER-NETO, H.; GRANER, C.A.F.; PEZZATO, L.E.; PADOVANI, L.R. Determinação de rotina do crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. **Revista Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 691-697, 2005.

BUDDINGTON, R.K.; KROGDHAL, Å; BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, Suppl. 638, p. 67-80, 1997.

CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 161 – 180, 2001.

CAMILO, R.Y. **Efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. Mestrado em Genética e Evolução - Universidade Federal de São Carlos, 66p., 2007.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M. da; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259-272, 2005.

CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. Relatório Científico (FAPESP). Botucatu, SP. 46p. 2006.

CASTAGNOLLI, N. Aqüicultura para o ano 2000. Brasília: CNPq, 95p. 1996.

CATALÁN, I.A.; OLIVAR, M.P. Quantification of muscle condition using digital image analysis in *Dicentrarchus labrax* larvae, and relationship with survival. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 82, n. 4, p. 649-654, 2002.

CHAKRABARTI, R.; RATHORE, R.M. Ontogenic changes in the digestive enzyme pattern and characterization of proteases in Indian major carp *Cirrhinus mrigala*. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 6, p. 569-581, 2010.

CHEN, B.N.; QIN, J.G.; KUMAR, M.S.; HUTCHINSON, W.; CLARKE, S. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. **Aquaculture**, v. 256, p. 489-501, 2006.

CLEOPHAS, G. M. L.; HARTINGSVALDT, W. V.; SOMERS, W. A. C. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. **World Poultry**, v. 11, n. 4, p. 12-15, 1995.

COMABELLA, Y.; FRANYUTTI, A. H.; HURTADO, A.; CANABAL, J.; GARCÍA-GALANO, T. Ontogenetic development of the digestive tract in cuban gar (*Atractosteus tristoechus*) larvae. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 245-260, 2013.

CORRÊA, C.F.; AGUIAR, L.H.; LUNDSTEDT, L.M.; MORAES, G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 147, n. 4, p. 857-862, 2007.

DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1882). **Aquaculture and Fisheries Management**, Abeokuta, v. 22, p. 397-403, 1991.

DEGANI, G.; VIOLA, S.; YEHUDA, Y. Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*). **Israeli Journal Aquaculture**, Bamidgeh, v. 49, n. 3, p. 115-123, Sept. 1997.

DEPLANO, M.; CONNES, R.; DIAZ, J.P.; BARNABÉ, G. Variation in the absorption of macromolecular proteins in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to exotrophic phase. **Marine Biology**, v. 110, p. 29-36, 1991.

DIAZ, J.P.; MANI-PONSET, L.; BLASCO, C.; CONNES, R. Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post – embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. **Aquatic Living Resources**, v. 15, n. 3, p. 169-178, 2002.

DIAZ, J.P.; GUYOT, E.; VIGIERAND, S.; CONNES, R. First events in lipid absorption during post-embryonic development of fish larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 51, n. 1, p. 180-192, 1997.

DIMES, L.E.; GARCÍA-CARREÑO, F.L.; HAARD, N.F. Estimation of protein digestibility- III Studies on the digestive enzymes from the pyloric caeca of rainbow trout and salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology**, v. 109, n. 2, p. 394-360, 1994.

FAGBENRO, O. Apparent digestibility of various legumes seed meals in Nile tilapia diets. **Aquaculture International**, Dodrecht, v. 6, n. 1, p. 83-87, 1998.

FALK-PETERSEN, I.B. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, n. 5, p. 397-412, 2005.

FERNÁNDEZ, I.; MOYANO, F.J.; DÍAZ, M.; MARTÍNEZ, T. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, n. 1, p. 1-12, 2000.

FIREMAN, F. A. T.; FIREMANN, A. K. B. A. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 173-178, jan./mar. 1998.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.

FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F.H. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 85-99. 1983.

GARCÍA-CARREÑO, F.; NAVARRETE, M. Classification of proteases without tears, **Biochemical Education**, v. 25, n. 3, p. 161-167. 1997.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.P.; LOZANO, M.T.; ELBAL, M.T. AGULLEIRO B.. Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies. **Anatomy and Embryology**, v. 204, n. 1, p. 39-57, 2001.

GISBERT, E.; GIMÉNEZ, G.; FERNÁNDEZ, L.; KOTZAMANIS, Y.; ESTÉVEZ, A. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. **Aquaculture**, v. 287, p. 381-387, 2009.

GISBERT, E.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; SARASQUETE, C. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. **Journal of Histology & Histopathology**, v. 23, n. 12, p. 1525-1539, 2008.

GISBERT, E.; PIEDRAHITA, R.H.; CONKLIN, D.E. Ontogenetic developmet of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. **Aquaculture**, v. 232, n. 1, p. 455 – 470, 2004.

GISBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; CASTELLÓ-ORVAY, F.; WILLIOT, P. A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. **Aquaculture**, v. 167, p. 195-209, 1998.

GISBERT, E.; SARASQUETE, M.C.; WILLIOT, P.; CASTELLO, F. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*,

Brandt) during early ontogeny. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. 3, p. 596-616, 1999.

GISBERT, E.; VILLENEUVE, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; QUAZUGUEL, P.; CAHU, C.L.. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. **Lipids**, v. 40, n. 6, p. 609-618, 2005.

GODINHO, H.P.; SANTOS, J.E.; SATO, Y. Ontogênese larval de cinco espécies do São Francisco, p. 133-148. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (Ed.) **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 468 p., 2003.

GURGEL, J.J.S.; FREITAS, J.V.F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 31, n. 1, p. 37- 44, 1973.

HAMLIN, H.J.; HERBING, I.H.V.; KLING, L.J. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock through post-hatching ontogeny. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 3, p. 716-732, 2000.

HE, T.; XIAO, Z.; LIU, Q.; MA, D.; XU, S.; XIAO, Y.; LI, J. Ontogeny of the digestive tract and enzymes in rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel 1844) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 297-308, 2012.

HENN, J. D. Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pósgraduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002.

HERNÁNDEZ, D. R.; SANTINÓN, J. J.; SÁNCHEZ, S.; DOMITROVIC, H. A. Estudio histológico e hitoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 5, p. 1136 – 1147, 2014.

HIDALGO, F.; ALLIOT, E. La digestión en los peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. (Ed.). **Nutrición en acuicultura I. Madrid: plan de formación de técnicos superiores en acuicultura**. Madrid, p. 85-107, 1987.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, n. 3, p. 267-283, 1999.

HILDSORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, 22: 73-87. 1995.

HOFER, R. Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology**, v. 72, n. 1, p. 55-63, 1981.

JOBLING, M. Fish bioenergetics. **Chapman & Hall**, 1^a Ed., London, England, 310p. 1994.

KAMACI, H.O.; COBAN, D.; SUZER, C.; SAKA, S.; FIRAT, K. Development of the Gastrointestinal Tract in Sharpsnout Sea Bream (*Diplodus puntazzo*) Larvae: Histological and Enzymatic Ontogeny. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 12, p. 2571-2579, 2009.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 181 – 201, 2001.

KROGDAHL, A.; HEMRE, G.I.; MOMMSEN, T.P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in post larval stages. **Aquaculture nutrition**, v. 11, n. 2, p.103-122, 2005.

LAZO, J.P.; DARIAS, M.J.; GISBERT E. **Ontogeny of the digestive tract**. p. 5-46. In: Larval Fish Nutrition. 1^o Ed. G.J. Holt (Ed.). Wiley-Blackwell, West Sussex, UK. 434p., 2011.

LIN, S.; MAI, K.; TAN, B.; LIU, W. Effects of Four Vegetable Protein Supplementation on Growth, Digestive Enzyme Activities, and Liver Functions of Juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 4, p. 583-593, 2010.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. 2^a Ed., New York: Kluwer Academic Publishers, p. 71-76, 1998.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman & Hall, 260p., 1989.

MAI, K.; YU, H.; MA, H.; DUAN, Q.; GISBERT, E.; ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 4, p. 1094-1106, 2005.

MEURER, F., HAYASHI, C., BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.* 31(2): 566 – 573. 2002.

MICALE, V.; GARAFFO, M.; GENOVESE, L.; SPEDICATO, M.T.; MUGLIA, U. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, v. 251, n. 2, p. 354-365, 2006.

MORAES, G.; ALMEIDA, L.C. Nutrição e Aspectos Funcionais da Digestão de Peixes. p. 233-252. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**, Jaboticabal: FUNEP; UNESP, p. 336, 2014.

MUNILLA-MORAN, R.; SABORIDO-REY, F. Digestive enzymes in Marine Species. I. Proteinase Activities in Gut from Redfish (*Sebastes mentella*), Seabream (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Comparative Biochemistry and Physiology B-biochemistry & Molecular Biology**, v. 113, n. 2, p. 395-402, 1996.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá (EDUAM), p. 115-119, 2001.

NELSON, D.V.; COX, M.M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, p. 377, 2000.

NOILLAC-DEPEYRE, J.; GÁS, N. Ultrastructural and cytochemical study of the gastric epithelium in a fresh water teleostean fish (*Perca fluviatilis*). **Tissue and Cell**, v. 10, n. 1, p. 23-37, 1978.

OLSEN, A.I.; ATTRAMADAL, Y.; REITAN, K.I.; OLSEN, Y. Food selection and digestion characteristic of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae fed cultivated prey organisms. **Aquaculture**, v. 181, n. 3-4, p. 293-310, 2000.

PENZ JÚNIOR, A. M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu-SP. **Anais...** Botucatu-SP, p. 165-178. 1998.

PRADHAN, P.K.; JENA, J.K.; MITRA, G.; SOOD, N.; GISBERT, E. Ontogeny of the digestive tract in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1601-1617, 2012.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. Manual de Piscicultura Tropical. Brasília: IBAMA, 196p. 1994.

ROTTA, M.A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do Sistema digestório dos peixes relacionados à piscicultura. EMBRAPA-CPAP. Corumbá, MS, Documento 53, p. 48, 2003.

SARASQUETE, C.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; MARTOS-SITCHA, J.A.; HERAS, V.; YÚFERA, M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. Ontogeny and functional histochemistry of the digestive and visual systems and other organs during the larval development of the thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus*. **Scientia Marina**, v. 78, n. 4, p. 473 – 491, 2014.

SHAHSAVARANI, I.A.; THOMAZ, Z.C.; BALLANTYNE, J.S.; WRIGHT, P.A. A novel technique for the separation of yolk from the developing embryonic tissue in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 321-326, 2002.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

SILVA, C.A.H. **Desempenho, enzimologia e metabolismo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas peletizadas e extrusadas com níveis médio e alto de lipídeos e carboidratos**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, 100p., 2008.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. Ed., Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, S. DE; ANDERSON, T. **Fish Nutrition in Aquaculture**. Aquaculture Series (Book 1), London: Chapman & Hall, p. 100-123, 1995.

SINGH, R.P.; NOSE, T. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. **Bulletin Freshwater Fish Research**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 21-25, 1967.

SOTO-SALANOVA, M. S. The use of enzymes to improve the nutritional value of corn-soy diets for poultry and swine. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO DE SUINOS E AVES, 1996, Campinas. **Proceedings...** Campinas: CBNA, p. 13. 1996.

STRYER, L.; BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. **Bioquímica**, 5ª Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1059p., 2004.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; CACECI, T.; SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 3/4, p. 317-327, Feb. 2000.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JUNIOR, M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta

microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

TREVIÑO, L.; ALVAREZ-CONZÁLEZ, C. A.; PERALES-GARCÍA, N.; ARÉVALO-GALÁN, L.; USCANGA-MARTÍNEZ, A.; MÁRQUEZ-COUTURIER, G.; FERNÁNDEZ, I.; GISBERT, E. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther, 1862 from hatching to the juvenile stage. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 1, p. 73-82, 2011.

UEBERSCHÄR, B. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. **Meeresforschung**, v. 32, p. 144 – 154, 1988.

WILSON, R.P.; POE, W.E. Apparent digestible protein and energy coefficients of common feed ingredients for Channel Catfish. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 47, n 3, p. 155-158, 1985.

YAMAMOTO, T.; UNUMA, T.; AKIYAMA, T. The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, n. 3, p. 353-372, 2000.

YOON, S.H.; ROBYT, J.F. Study of inhibition of four alpha amylase by acarbose and its 4IV- α -maltododecaosy analogues. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 19, p.1969-1980, 2003.

YUFERA, M.; DARIAS, M.J. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 53-63, 2007.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 98-105, 2007.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; GISBERT, E.; SARASQUETE, C.; NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J.; CAHU, C.L. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. **Feeding and Digestive Functions of Fishes**, p. 281-348, 2008.

ZANELLA, I.; SAKAMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRO, P. M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets base don corn and soybeans. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 561-568, Apr. 1999.

4 ARTIGO 1 - DESEMPENHO E MORFOMETRIA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE *Astronotus ocellatus* ALIMENTADOS COM RAÇÃO COMERCIAL SUPLEMENTADA COM COMPLEXO ENZIMÁTICO

RESUMO

O *Astronotus ocellatus* é uma espécie de peixe, nativo da Bacia Amazônica, com alto potencial para a aquicultura, tanto de corte como ornamental. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da inclusão de cinco níveis de complexo enzimático em uma ração comercial na alimentação de juvenis de *Astronotus ocellatus*. Foram testados seis tratamentos com três repetições cada. Um tratamento foi o controle (sem adição de complexo enzimático), e os outros receberam os níveis de 0,0660%; 0,0132%; 0,0200%; 0,0266%; 0,0320%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia no período de 45 dias. Os tratamentos controle e 0,0266% de inclusão foram os que apresentaram os melhores resultados para comprimento e ganho de peso. Não houve efeito significativo para os parâmetros morfométricos avaliados. Como conclusão, a inclusão de complexo enzimático não apresentou diferença nos resultados de parâmetros de desempenho ou na morfometria dos órgãos alvo.

Palavras-chave: Nutrição, Piscicultura, Ciclídeos

PERFORMANCE AND MORPHOMETRY OF THE DIGESTIVE TRACT OF *Astronotus ocellatus* JUVENILES FED WITH COMERCIAL FEED SUPPLEMENTED WITH ENZYMATIC COMPLEX

ABSTRACT

Astronotus ocellatus is a species of fish, native to the Amazon Basin, with high potential for both cut and ornamental aquaculture. The objective of this work was to evaluate the effect of the inclusion of five levels of enzymatic complex in a commercial feed in juveniles of *Astronotus ocellatus*. Six treatments with three replicates were tested. One treatment was the control (without addition of enzyme complex), and the others received the levels of 0.0660%; 0.0132%; 0.0200%; 0.0266%; 0.0320%. The animals were fed four times a day within 45 days. Control and 0.0266% inclusion treatments presented the best results for length and weight

gain. There was no significant effect on the morphometric parameters evaluated. In conclusion, the inclusion of enzyme complex showed no difference in the results of performance parameters or morphometry of the target organs.

Key-words: Nutrition, Fish farming, Ciclídeos

INTRODUÇÃO

O *Astronotus ocellatus*, popularmente conhecido como apaiari ou oscar, é um peixe da Família Cichlidae, nativo da Bacia Amazônica. Esta espécie tem grande potencial para a piscicultura comercial devido a sua carne firme, saborosa e ausência de espinhas intramusculares (FONTENELE e NEPOMUCENO, 1983). Além disso, seu comportamento agressivo e sua coloração atraente fazem com que a espécie apresente atrativos para a aquariofilia, com exemplares cultivados no mundo todo para esta finalidade (FONTENELE, 1982).

Apesar de ser uma espécie nativa de importância econômica tanto para a piscicultura ornamental quanto para produção de proteína na nutrição humana, estudos direcionados para o aprimoramento de sua tecnologia de produção e desenvolvimento de rações específicas ainda são escassos.

As enzimas digestórias são hidrolases, isto é, proteínas globulares capazes de catalisar a hidrólise de ligações entre carboidratos (carboidrases) e lipídios (lipases), e as ligações das proteínas (proteases) e ácidos nucleicos (nucleases). Algumas destas são secretadas na forma de precursores inativos ou zimogênios, que podem ser ativados pelos próprios sucos gástricos e/ou enzimas proteolíticas já ativas (COHEN, 1979; SCHMIDT-NIELSEN, 1999).

Estudos com suplementação de enzimas exógenas em larvas e juvenis de peixes têm apresentado resultados distintos em relação a sua eficiência. Kolkovski (2001) concluiu que o efeito das enzimas digestivas nas dietas é dependente da idade, espécie e do tipo de enzima digestiva, bem como, do hábito alimentar da espécie. O efeito da adição de enzimas digestivas na ração tem sido estudado para algumas espécies de peixes continentais, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (TESSER et al., 2006) e tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (SIGNOR et al., 2010). Entretanto, o *A. ocellatus* ainda requer estudos com objetivo de obter o melhor aproveitamento de dietas microparticuladas e, conseqüentemente, melhor desempenho zootécnico em sistemas de cultivo intensivo.

Após o desenvolvimento completo do trato digestório, juvenis transformam seus hábitos alimentares aos das espécies, este desenvolvimento também inclui uma adaptação morfológica e funcional. Em muitas espécies estudadas, em fato, o desenvolvimento do trato digestório é caracterizado por um aumento mais ou menos drástico de enzimas digestivas e muitas vezes por uma mudança no padrão enzimático (SEGNER et al., 1989; SUZER et al., 2007; ZAMBONINO INFANTE e CAHU, 1994; GISBERT et al., 2009).

Aspectos da organização histológica do trato digestório durante a ontogenia inicial ou sob diferentes condições alimentares podem ser considerados como valioso biomarcador para acessar as condições nutricionais e avaliar o efeito de dietas desbalanceadas em larvas e juvenis (GISBERT et al., 2008). Nesse sentido, Treviño et al. (2011) relataram que o intestino e o fígado são considerados bons alvos de estudo, já que suas organizações histológicas são particularmente sensíveis à quantidade e a qualidade da dieta.

O presente trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar o melhor nível de inclusão de um complexo multienzimático no desempenho e morfologia do aparelho digestório de juvenis de apaiari (*Astronotus ocellatus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Ambiente experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioensaios em Aquicultura Intensiva da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes-RJ. O processamento do material foi realizado no Laboratório de Zootecnia (LZO) situado no Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária (CCTA) e no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Os animais utilizados no experimento foram provenientes do plantel de *Astronotus ocellatus* do setor de piscicultura do LZO/CCTA. Foram utilizados peixes de uma mesma desova, com idade de 60 dias. Os animais foram mantidos em aquários experimentais com volume útil de 20 litros, em uma densidade de 8 peixes por aquário. Os aquários foram acoplados a um sistema de recirculação de água composto de filtro mecânico e biológico, além de um aquário de retorno composto

de bomba subaquática com capacidade nominal de 4000 litros por hora, termostato e lâmpada ultravioleta.

Para iniciar o experimento, todos os animais passaram por uma biometria inicial (uso de anestésico, Eugenol) para aferição de comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (A) e peso (P). Os peixes apresentaram valores iniciais de comprimento total, comprimento padrão, altura e peso de 41,2 mm, 30,9 mm, 13,8 mm e 1,3 g, respectivamente.

A qualidade da água do sistema foi monitorada diariamente através de mensuração de pH, oxigênio dissolvido e temperatura, e semanalmente por medições de amônia total. Para evitar variações nestes parâmetros foi feita limpeza dos aquários com troca de água parcial diariamente, evitando-se assim sobrecarga de matéria orgânica no sistema e quando necessário o pH foi reajustado com uso de calcário.

Desenho experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e três repetições totalizando 18 unidades experimentais, a saber:

- T1 - Ração controle (sem adição de complexo enzimático);
- T2 - Ração com adição de 0,0066% de complexo enzimático;
- T3 - Ração com adição de 0,0132% de complexo enzimático;
- T4 - Ração com adição de 0,0200% de complexo enzimático;
- T5 – Ração com adição de 0,0266% de complexo enzimático;
- T6 – Ração com adição de 0,032% de complexo enzimático.

Os animais foram alimentados *ad libitum*, quatro vezes ao dia, nos horários de 8:00, 11:00, 14:00 e 17:00 horas.

O complexo enzimático utilizado foi o Allzyme® SSF; este contém uma fórmula única do produto da fermentação do *Aspergillus niger*. Sua composição é representada por: fitase (300 SPU/g), protease (700 HUT/g), celulase (40 CMCU/g), xilanase (100XU/g), betaglucanase (200 BGU/g), amilase (30 FAU/g) e pectinase (4000 AJDM/g).

As rações experimentais foram elaboradas a partir de uma ração comercial padrão para juvenis, com 40% de proteína bruta (Tabela 1). Esta ração foi moída e o complexo enzimático foi adicionado com auxílio de misturador em Y. Cada ração,

após receber a dose de complexo enzimático, foi homogeneizada no misturador por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida ao processo de peletização em equipamento tipo moedor de carne, equipado com matriz de 0,3mm. Para o processo, as rações foram umedecidas com água pré-aquecida a 50°C, peletizadas e, posteriormente, seca em estufa com ventilação forçada por 24 horas a 55°C. Os peletes foram desintegrados de modo a apresentarem granulometria adequada ao tamanho da boca dos animais.

Tabela 1: Níveis de garantia fornecido pelo fabricante da ração.

Níveis de Garantia	
Beta-glucanos (Mín.)	875,00 mg/kg
Mananoligossacarídeos (Mín.)	1000,00 mg/kg
Vitamina C (Mín.)	600,00 mg/kg
Vitamina E (Mín.)	170,00 UI/kg
Umidade (Máx.)	130,00 g/kg
Proteína Bruta (Mín.)	400,00 g/kg
Extrato Etéreo (Mín.)	80,00 g/kg
Fibra Bruta (Máx.)	140,00 g/kg
Matéria Mineral (Máx.)	140,00 g/kg
Cálcio (Mín.)	12,00 g/kg
Cálcio (Máx.)	30,00 g/kg
Fósforo (Mín.)	6.000,00 mg/kg

Biometria

Ao término de 45 dias, foi feita biometria de todos os animais para obtenção do comprimento total, comprimento padrão, altura e peso. Antes da biometria os animais foram eutanaziados por choque térmico em água a 0°C, e posteriormente à aferição dos dados foi realizada dissecação e fixação dos órgãos alvo (intestino e fígado). Foi utilizada formalina neutra tamponada a 10% como fixador dos tecidos.

A partir dos dados biométricos foram encontrados os seguintes parâmetros:

- Ganho de peso (GP)= Peso final – Peso inicial

- Taxa de crescimento específico (TCE)%= $[(\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial})/\text{tempo}] \times 100$
- Conversão alimentar (CA)= $\text{Alimento ingerido (g)}/\text{ganho de peso úmido (g)}$
- Índice hepatossomático (HSI)= $(\text{peso do fígado}/\text{peso do corpo todo}) \times 100$
- Índice digestossomático (DSI)= $(\text{peso do trato digestivo}/\text{peso do corpo todo}) \times 100$

Para avaliação do efeito dos tratamentos, após a biometria final, os animais foram submetidos a análise morfológica do trato digestório (histologia).

Análises histológicas

Após a obtenção das amostras de fígado e intestino, foram confeccionadas lâminas permanentes coradas em hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica. Todas as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF.

Todos os tecidos coletados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e imediatamente fixados. Cada amostra foi fixada por um período mínimo de 24 horas.

A seguir as amostras foram clivadas, se necessário, e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica® TP1020), onde foram desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. A seguir foi procedida à clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em sequência, o material foi incluído no próprio histossete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de cinco micrômetros de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145). Os cortes foram colocados em banheira histológica, de onde foram coletados com

lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica.

As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital Infinity1® e software Infinity Analyze®, adaptada em microscópio óptico (Nikon® ECLIPSE E2000).

Análises estatísticas

Os dados das variáveis obtidos foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância e, em caso de diferenças, foi aplicado o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico SAS 9.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, os valores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura foram mensurados diariamente, com valores respectivos de $6,31 \pm 0,41$, $6,35 \pm 0,34$ mg/l, $30,41 \pm 1,06$ °C. Os valores registrados se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos para peixes tropicais (KUBITZA, 2000).

Os resultados para os parâmetros zootécnicos dos juvenis de *Astronotus ocellatus* alimentados com as rações comerciais suplementadas com níveis crescentes do complexo enzimático (CE) Allzyme® estão representados na Tabela 2.

O tratamento que recebeu suplementação ao nível de 0,0266% de CE e o tratamento controle (sem inclusão de CE) foram significativamente ($P < 0,05$) superior para comprimento total e comprimento padrão com relação ao tratamento que recebeu 0,0132%, não diferenciando-se dos demais. Não houve diferença significativa para as variáveis altura e taxa de crescimento específico.

Tabela 2: Comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (H), peso (P), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) de *Astronotus ocellatus*.

Nível de enzima	CT (mm)	CP (mm)	H (mm)	P (g)	GP (g)	TCE
0	68,09 ^a	51,67 ^a	23,48 ^a	6,87 ^{ab}	5,57 ^{ab}	3,70 ^a
0,0066	65,36 ^{ab}	50,32 ^{ab}	21,93 ^a	6,20 ^{ab}	4,90 ^{ab}	3,47 ^a
0,0132	63,28 ^b	47,52 ^b	21,90 ^a	5,90 ^b	4,59 ^b	3,35 ^a
0,0200	65,15 ^{ab}	49,58 ^{ab}	22,42 ^a	5,94 ^b	4,64 ^b	3,36 ^a
0,0266	69,81 ^a	52,96 ^a	23,90 ^a	7,44 ^a	6,13 ^a	3,86 ^a
0,0320	67,35 ^{ab}	50,74 ^{ab}	23,02 ^a	6,42 ^{ab}	5,12 ^{ab}	3,54 ^a
CV (%)	2,59	2,85	3,85	8,24	10,39	5,43

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05)

As variáveis de peso e ganho de peso demonstrou que o tratamento com 0,0266% de inclusão foi superior estatisticamente (P< 0,05) aos tratamentos com inclusão de 0,0132% e 0,0200%. Esse resultado pode ser devido ao fato de que os animais alimentados com rações com suplementação de 0,0266% foram mais eficientes no aproveitamento da energia e proteína dos alimentos. Foi relatado resultado semelhante por Oliveira et al. (2007), onde os autores relataram que o uso de complexo enzimático, composto por enzimas com características sinérgicas e aditivas, foi eficiente no aproveitamento de energia e proteína dos alimentos. Bock et al. (2007), avaliaram que o uso de fitase foi eficiente na disponibilização de fósforo dos alimentos.

O resultado para os parâmetros de consumo de ração e conversão alimentar não apresentaram diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos (Tabela 3). Entretanto, a conversão alimentar no tratamento com inclusão de 0,0266% de CE apresentou maior eficiência, mesmo não apresentando diferença significativa. O resultado encontrado no trabalho vai de acordo com os relatos da literatura, que apresenta atuação das enzimas como auxiliares no processo digestivo, de modo a melhorar a digestibilidade dos nutrientes (COSTA et al., 2004).

Os tratamentos testados não exerceram influência sobre os parâmetros de índice hepatossomático, índice digestossomático e sobrevivência. Os resultados

para as variáveis citadas anteriormente, bem como, para consumo de ração por peixe e conversão alimentar estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Índice hepatossomático (IHS), índice digestossomático (IDS), consumo de ração por peixe (CrPX), conversão alimentar (CAA), sobrevivência (SB%) de juvenis de *Astronotus ocellatus*.

Níveis de enzima	IHS	IDS	CrPX (g)	CAA	SB%
0	1,91 ^a	2,24 ^a	7,34 ^a	1,33 ^a	95,83 ^a
0,0066	2,28 ^a	2,76 ^a	6,75 ^a	1,38 ^a	91,67 ^a
0,0132	2,61 ^a	2,47 ^a	6,87 ^a	1,50 ^a	95,83 ^a
0,0200	2,02 ^a	2,70 ^a	6,81 ^a	1,48 ^a	100,00 ^a
0,0266	2,18 ^a	2,71 ^a	7,37 ^a	1,20 ^a	91,67 ^a
0,0320	1,87 ^a	2,27 ^a	7,12 ^a	1,40 ^a	95,83 ^a
CV (%)	17,80	21,20	5,36	8,15	6,92

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05)

O resultado das análises morfométricas para os parâmetros de altura, largura, metade da largura das vilosidades e número de células do fígado não apresentaram diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado dos parâmetros morfométricos.

Níveis de enzima	ALT (µm)	LARG (µm)	½ (µm)	Nº CEL
0	543,31 ^a	102,57 ^a	56,03 ^a	132,33 ^a
0,0066	555,31 ^a	96,51 ^a	49,28 ^a	140,00 ^a
0,0132	494,25 ^a	96,25 ^a	52,65 ^a	125,33 ^a
0,0200	445,07 ^a	95,15 ^a	49,27 ^a	187,67 ^a
0,0266	470,52 ^a	104,62 ^a	55,51 ^a	167,67 ^a
0,0320	472,47 ^a	102,47 ^a	53,61 ^a	166,33 ^a
CV (%)	8,80	6,05	12,73	22,13

ALT: altura das vilosidades do intestino; LARG: largura das vilosidades do intestino; ½: metade da largura das vilosidades do intestino; Nº CEL: número de células do fígado.

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05)

O trato gastrointestinal apresenta uma alta variabilidade na estrutura de acordo com a dieta (BUDDINGTON et al., 1997). É comumente enfatizado que as espécies de peixes herbívoros e detritívoro tendem a ter intestinos mais longos, mais finos e mais estreito do que os carnívoros (FANGE & GROVE, 1979; JÜNGER et al, 1989, FUGI et al, 2001), e o intestino das espécies onívoras têm um comprimento intermediário (WARD-CAMPBELL et al., 2005). Comprimento intestinal e área também podem ser afetados pelos hábitos alimentares (BUDDINGTON et al., 1997). No presente experimento, o fator alimentar não foi suficiente para promover mudança nos parâmetros morfométricos analisados.

Segundo Merrifield et al. (2010), a mudança na alimentação com substituição de produtos de origem animal por produtos de origem vegetal, podem gerar desafios metabólicos e de saúde para os peixes cultivados. Ao usar altos níveis dietéticos de materiais derivados de plantas, particularmente aqueles derivados de soja, é importante considerar os impactos na microbiota intestinal e na histologia intestinal, pois o trato gastrointestinal pode ser uma das importantes rotas de infecção para alguns patógenos em peixes.

A utilização de 0,0266% de complexo enzimático em dietas para juvenis de *Astronotus ocellatus* apresentou resultado superior estatisticamente para as variáveis peso e ganho de peso, sobre os tratamentos com suplementação de 0,0132% e 0,0200%. A utilização de complexo enzimático não afetou os parâmetros morfométricos dos peixes, portanto, o fator nutricional não foi suficiente para promover alterações nos parâmetros analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZERRA e SILVA, J.W.; REGIS, R.C.; BEZERRA, A.T. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, n. 1-2, p. 22-26, 1993.

BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A. et al. Fitase em rações para tilápia do Nilo na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1455-1461, 2007.

BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A. et al. Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápias do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2198-2202, 2006.

BUDDINGTON, R.K.; KROGDAHAL, Å; BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, Suppl. 638, p. 67-80, 1997.

COSTA, F.G.P.; CLEMENTINO, R.H.; JÁCOME, I.M.T.D. et al. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.2, p.63-71, 2004.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.

FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F.H. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 85-99. 1983.

FURUYA, W.M.; NEVES, P.R.; SILVA, L.C.R. et al. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão de sexo. **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.299-303, 2004.

FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S. FURUYA, V.R.B. et al. Fitase na alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p. 924-929, 2001.

GISBERT, E.; GIMÉNEZ, G.; FERNÁNDEZ, L.; KOTZAMANIS, Y.; ESTÉVEZ, A. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. **Aquaculture**, v. 287, p. 381-387, 2009.

GISBERT, E.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; SARASQUETE, C. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. **Journal of Histology & Histopathology**, v. 23, n. 12, p. 1525-1539, 2008.

GOMINHO-ROSA, M. C.; RODRIGUES, A. P. O.; MATTIONI, B.; FRANCISCO, A.; MORAES, G.; FRACALLOSSI, D. M.. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p.92-99, jan. 2015.

GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M. et al. Digestibilidade aparente e suplementação de fitase em alimentos vegetais para a tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.313-321, 2004.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 181 – 201, 2001.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiá: Fernando Kubitza, 289p. 2000.

NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M. et al. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.R., Børgwald, J., Castex, M., Ringø, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture** 302, 1-18. 2010.

MOURA, G.S.; ALIVEIRA, M.G.A.; LANNA, E.T.A. et al. Desempenho e atividade de amilase em tilápias do Nilo submetidas a diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.11, p.1609-1615, 2007.

OLIVEIRA, G.R.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F. et al. Digestibilidade de nutrientes em rações com complexo multienzimático para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1945-1952, 2007.

OUHIDA, I.; PEREZ, J.F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1933-1938, 2002.

RODRIGUES, A.P.O., GOMINHO-ROSA, M.D.C., CARGNIN-FERREIRA, E., DE FRANCISCO, A., FRACALOSSO, D.M. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquac. Nutr.** 18, 65–72. 2012.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JUNIOR, M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 98-105, 2007.

5 ARTIGO 2 - EFEITO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO *Allzyme*® SSF NA NUTRIÇÃO E MORFOMETRIA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE *Astronotus ocellatus*

RESUMO

O *Astronotus ocellatus* é uma espécie de peixe, nativo da Bacia Amazônica, com alto potencial para a aquicultura, tanto de corte como ornamental. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da inclusão de quatro níveis de complexo enzimático em uma ração com substituição de 20% da farinha de peixes por farelo de soja, na alimentação de juvenis de *Astronotus ocellatus*. Foram testados cinco tratamentos com quatro repetições cada, um tratamento foi o controle (sem adição de complexo enzimático), e os outros receberam os níveis de 0,066%; 0,0132%; 0,0200%; e 0,0266%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia no período de 30 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho analisados. Para os parâmetros morfométricos, o tratamento com 0,0266% de complexo enzimático apresentou a melhor resposta. Como conclusão, a inclusão de complexo enzimático não apresentou diferença nos resultados de desempenho, mas houve uma melhora significativa na morfometria dos animais a medida que aumentava os níveis de complexo enzimático.

Palavras-chave: Nutrição, Piscicultura, Ciclídeos

EFFECT OF THE *Allzyme*® SSF ENZYMATIC COMPLEX ON NUTRITION AND MORPHOMETRY OF THE DIGESTIVE TRACT OF JUVENILES OF *Astronotus ocellatus*

ABSTRACT

Astronotus ocellatus is a species of fish, native to the Amazon Basin, with high potential for aquiculture, both cut and ornamental. The objective of the present work was to evaluate the effect of the inclusion of four levels of enzyme complex in a diet with substitution of 20% of fishmeal per soybean meal in the diet of juveniles of *Astronotus ocellatus*. Five treatments were tested with four replicates each, one treatment was the control (without addition of enzyme complex), and the others received levels of 0.066%; 0.0132%; 0.0200%; and 0.0266%. The animals were fed four times daily within 30 days. There was no significant difference between the

treatments for the performance parameters analyzed. For the morphometric parameters, treatment with 0.0266% enzyme complex presented the best response. In conclusion, the inclusion of enzyme complex showed no difference in the performance results, but there was a significant improvement in the morphometry of the animals as the levels of enzyme complex increased.

Key-words: Nutrition, Fish farming, Ciclídeos

INTRODUÇÃO

O *Astronotus ocellatus*, espécie popularmente conhecida como apaiari ou oscar, é um ciclídeo originário da Bacia Amazônica, adaptado e disseminado desde 1938 em açudes e rios do Nordeste brasileiro pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), encontrado em quase todo o país (FONTENELE, 1982).

O apaiari apresenta corpo de conformação robusta, achatado lateralmente, relativamente alto em relação ao comprimento, região dorsal espessa e sem espinhas intramusculares, cor parda escura ou castanha, com manchas verticais vermelho-claras, nadadeira dorsal e anal com espinhos, nadadeira caudal arredondada, cabeça pequena em relação ao corpo, olhos grandes e linha lateral interrompida. Uma das características desta espécie é um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira de mesmo nome (FONTENELE e NEPOMUCENO, 1983).

Na área da nutrição animal, as pesquisas têm sido realizadas visando alternativas na formulação da dieta, de modo a desenvolver rações mais eficientes e economicamente viáveis, visto que a ração na piscicultura representa a maior parcela no custo total de produção.

Os grãos de soja possuem quantidades elevadas de substâncias pécticas na parede celular (COSTA et AL., 2004). Segundo Ouhida et al. (2002), o tratamento de cascas e cotilédones de soja com enzimas degradadoras de parede celular (pectinase, xilanase e celulase) resulta na liberação de, pelo menos, 7% dos monossacarídeos componentes das frações não solúveis em água.

Os complexos enzimáticos não apresentam função nutricional direta, mas, atuam como auxiliador no processo digestivo, de modo a melhorar a digestibilidade dos nutrientes. A atuação das enzimas exógenas ocorre da mesma forma que as

enzimas endógenas, apresentando um sítio ativo com a capacidade de atuar sobre substratos específicos, hidrolisando-os (COSTA et al., 2004).

O uso de subprodutos vegetais na alimentação de peixes é economicamente viável devido sua ampla disponibilidade e, conseqüentemente, menor custo. Os usos de enzimas exógenas nas rações de peixes são excelentes alternativas para melhora a digestibilidade do farelo de soja e reduzir os custos com farinha de peixes.

Estudos com suplementação de enzimas exógenas em larvas e juvenis de peixes têm apresentado resultados distintos em relação a sua eficiência. Kolkovski (2001) concluiu que o efeito das enzimas digestivas nas dietas é dependente da idade, espécie e do tipo de enzima digestiva, bem como, do hábito alimentar da espécie. O efeito da adição de enzimas digestivas na ração tem sido estudado para algumas espécies de peixes continentais, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (TESSER et al., 2006) e tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (SIGNOR et al., 2010).

Aspectos da organização histológica do trato digestório de peixes sob diferentes condições alimentares podem ser considerados como valioso biomarcador para acessar as condições nutricionais e avaliar o efeito de dietas desbalanceadas em larvas e juvenis (GISBERT et al., 2008). Nesse sentido, Treviño et al. (2011) relataram que o intestino e o fígado são considerados bons alvos de estudo, já que suas organizações histológicas são particularmente sensíveis à quantidade e a qualidade da dieta.

O presente trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar o melhor nível de inclusão e o efeito da incorporação de um complexo multienzimático em uma ração com substituição parcial da farinha de peixe pelo farelo de soja, no desempenho e morfometria do aparelho digestório de juvenis de apaiari (*Astronotus ocellatus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Ambiente experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioensaios em Aquicultura Intensiva da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes-RJ. O processamento do material foi realizado no Laboratório de Zootecnia (LZO) situado no Centro de Ciências e Tecnologia

Agropecuária (CCTA) e no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Os animais utilizados no experimento foram adquiridos junto a produtores de Muriaé (*Astronotus ocellatus*). Ao início do experimento os animais foram distribuídos nos aquários na densidade de 10 animais por aquário.

A unidade experimental utilizada foi um aquário de vidro, com volume útil de 20 litros. Os aquários foram acoplados a um sistema de recirculação de água composto de filtro mecânico e biológico, além de um aquário de retorno composto de bomba subaquática com capacidade nominal de 4000 litros por hora, termostato e lâmpada ultravioleta.

Ao início do experimento, todos os animais passaram por uma biometria inicial (uso de anestésico, Eugenol) para aferição de comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (A) e peso (P). Os peixes apresentaram valores iniciais de comprimento total, comprimento padrão, altura e peso de 37,8 mm, 29 mm, 12,1 mm e 0,91 g, respectivamente.

A qualidade da água do sistema foi monitorada diariamente através de mensuração de pH, oxigênio dissolvido e temperatura. Para evitar variações nestes parâmetros foi feita limpeza dos aquários com troca de água parcial diariamente, evitando-se assim sobrecarga de matéria orgânica no sistema e quando necessário o pH foi reajustado com uso de calcário.

Desenho experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições totalizando 20 unidades experimentais, a saber:

- T1 - Ração controle (sem adição de complexo enzimático);
- T2 - Ração com adição de 0,0066% de complexo enzimático;
- T3 - Ração com adição de 0,0132% de complexo enzimático;
- T4 - Ração com adição de 0,0200% de complexo enzimático;
- T5 – Ração com adição de 0,0266% de complexo enzimático;

Os animais foram alimentados *ad libitum*, quatro vezes ao dia, nos horários de 9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 horas. O foto-período foi controlado artificialmente, com um total de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, sendo que, as luzes se acendiam às 7h e se apagavam às 21h.

O complexo enzimático utilizado foi o Allzyme® SSF; este contém uma fórmula única do produto da fermentação do *Aspergillus niger*. Sua composição é representada por: fitase (300 SPU/g), protease (700 HUT/g), celulase (40 CMCU/g), xilanase (100XU/g), betaglucanase (200 BGU/g), amilase (30 FAU/g) e pectinase (4000 AJDM/g).

As rações experimentais foram elaboradas com o auxílio do programa computacional Super Crac®. Para a confecção das rações foram utilizados ingredientes tradicionais como farinha de peixe, farelo de soja, farelo de milho, óleo de soja, além de premix mineral-vitamínico (Tabela 1). Os alimentos foram moídos e homogeneizados em misturador tipo “Y”. Em seguida, o premix mineral-vitamínico, o óleo de soja e o complexo enzimático foram adicionados e misturados aos alimentos. A peletização foi feita através de peletizadora com umedecimento prévio da mistura com água a 50°C. Após o processamento, os peletes foram secos em estufa (55°C) de ventilação forçada por 24 horas e desintegrados de modo a apresentarem granulometria adequada ao tamanho da boca dos animais. As rações foram identificadas e armazenadas em recipientes plásticos à temperatura ambiente até o início do experimento.

Tabela 1: Composição base das rações experimentais.

Ingrediente	Quantidade (%)
Peixe farinha 55%	53,9772
Soja farelo 45%	20,0000
Milho grão	17,0154
Óleo de soja	6,0074
Vitcre-peixe	2,0000
Fosfato bicalcico	1,0000
Total	100
Composição calculada	
Cálcio %	3,5881
Fosforo total %	2,3896
Met. + cistina total %	1,5638
Metionina total %	1,0064
Fibra Bruta %	1,8936
Ener. Dig. Peixe Mkal/kg	2,8000
Proteína Bruta %	40

Biometria

Ao término do experimento foi feita biometria dos animais para obtenção do comprimento total, comprimento padrão, altura e peso. Antes da biometria, os

animais foram submetidos à eutanásia por choque térmico em água a 0°C, e posteriormente à aferição dos dados foi realizada dissecação e fixação dos órgãos alvo. Foi utilizada formalina neutra tamponada a 10% como fixador dos tecidos.

A partir dos dados biométricos foram encontrados os seguintes parâmetros:

- Ganho de peso (GP)= Peso final – Peso inicial
- Taxa de crescimento específico (TCE)%= $[(\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial})/\text{tempo}] \times 100$
- Conversão alimentar (CA)= Alimento ingerido (g)/ganho de peso úmido (g)
- Índice hepatossomático (HSI)= (peso do fígado/peso do corpo todo) x 100
- Índice digestossomático (DSI)= (peso do trato digestivo/peso do corpo todo) x 100

Para avaliação do efeito dos tratamentos, após a biometria final, os animais foram submetidos a análise morfológica do trato digestório (histologia).

Análises histológicas

A partir desta análise foram confeccionadas as lâminas permanentes coradas em hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica. Todas as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF.

Todos os tecidos coletados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e imediatamente fixados. Cada amostra foi fixada por um período mínimo de 24 horas.

A seguir as amostras foram clivadas, se necessário, e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica® TP1020), onde foram desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. A seguir foi procedida à clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos

cada, em parafina histológica a 60°C. Em sequência, o material foi incluído no próprio histossete em que foi acondicionado, técnicas especiais poderão ser empregadas se necessários.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de cinco micrômetros de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145). Os cortes foram colocados em banheira histológica, de onde foram coletados com lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica.

As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital Infinity1® e software Infinity Analyze®, adaptada em microscópio óptico (Nikon® ECLIPSE E2000).

Análises estatísticas

Os dados das variáveis obtidos foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância e, em caso de diferenças, foi aplicado o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico SAS 9.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Durante o período experimental, os valores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura foram mensurados diariamente, com valores respectivos de $6,74 \pm 0,50$, $6,45 \pm 0,67$ mg/l, $29,03 \pm 0,67$ °C. Os valores registrados se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos para peixes tropicais (KUBITZA, 2000).

A suplementação do complexo enzimático nas rações com substituição parcial da farinha de peixe pelo farelo de soja, não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) nos fatores de desempenho em juvenis de apaiari (*Astronotus ocellatus*) (Tabela 2).

Tabela 2: Comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (H), peso (P), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) de *Astronotus ocellatus*.

Nível de enzima	CT (mm)	CP (mm)	H (mm)	P (g)	GP (g)	TCE
0	55,22 ^a	42,41 ^a	19,14 ^a	3,23 ^a	2,29 ^a	3,95 ^a
0,0066	54,81 ^a	41,71 ^a	19,36 ^a	3,21 ^a	2,30 ^a	4,03 ^a
0,0132	55,47 ^a	42,23 ^a	19,75 ^a	3,54 ^a	2,62 ^a	4,12 ^a
0,0200	54,43 ^a	40,95 ^a	18,68 ^a	3,13 ^a	2,21 ^a	3,78 ^a
0,0266	58,01 ^a	44,36 ^a	20,77 ^a	3,91 ^a	3,00 ^a	4,60 ^a
CV (%)	3,59	4,33	5,11	13,04	17,61	9,30

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

O tratamento com 0,0266% de complexo enzimático foi o que apresentou os valores mais altos nos parâmetros apresentados na Tabela 2. Entretanto, a diferença não foi suficiente para representar diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

O tratamento com inclusão de 0,0200% de CE foi o que apresentou menores valores de ganho de peso e taxa de crescimento específico, sendo inclusive, menor que o tratamento controle (sem adição de CE). Os outros tratamentos que receberam inclusão de CE em sua composição se apresentaram superiores nesses parâmetros em comparação com o tratamento sem inclusão de CE, mesmo que a diferença tenha sido mínima.

Os resultados dos parâmetros de consumo de ração por peixe, conversão alimentar, comprimento do intestino, índice hepatossomático e digestossomático não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Os tratamentos propostos não influenciaram na sobrevivência (Tabela 3).

Tabela 3: Comprimento do intestino (Ci), índice hepatossomático (IHS), índice digestossomático (IDS), consumo de ração por peixe (CrPX), conversão alimentar (CAA), sobrevivência (SB%) de juvenis de *Astronotus ocellatus*.

Níveis de enzima	Ci (mm)	IHS	IDS	CrPX (g)	CAA	SB%
0	65,65 ^a	2,67 ^a	5,40 ^a	3,82 ^a	1,73 ^a	90,00 ^a
0,0066	61,18 ^a	2,66 ^a	5,65 ^a	3,87 ^a	1,70 ^a	92,50 ^a
0,0132	69,58 ^a	2,73 ^a	5,46 ^a	4,15 ^a	1,66 ^a	87,50 ^a
0,0200	60,71 ^a	2,88 ^a	5,52 ^a	3,98 ^a	1,94 ^a	90,00 ^a
0,0266	72,34 ^a	2,64 ^a	5,74 ^a	4,19 ^a	1,53 ^a	87,50 ^a
CV (%)	12,33	13,30	9,06	11,96	24,57	11,63

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05)

As análises morfométricas do intestino seguiram os indicativos dos parâmetros de desempenho observados no trabalho (Tabela 4). Desse modo, foram registrados os melhores valores para o nível de 0,0266 % de CE. O tratamento diferiu significativamente (P>0,05) em relação ao tratamento controle, para altura das vilosidades e, em relação ao tratamento com adição de 0,0200%, para largura. Demonstrando eficiência deste tratamento em melhorar a capacidade de absorção da ração pelos peixes.

Tabela 4: Resultado dos parâmetros morfométricos.

Níveis de enzima	ALT (µm)	LARG (µm)	½ (µm)	Nº CEL
0	466,33 ^b	80,23 ^{ab}	38,13 ^a	219,50 ^a
0,0066	499,10 ^{ab}	94,44 ^{ab}	42,02 ^a	214,50 ^a
0,0132	533,57 ^{ab}	92,04 ^{ab}	39,42 ^a	188,25 ^a
0,0200	516,34 ^{ab}	78,58 ^b	39,05 ^a	263,50 ^a
0,0266	568,94 ^a	101,93 ^a	45,60 ^a	279,25 ^a
CV (%)	6,58	11,15	13,27	25,77

ALT: altura das vilosidades do intestino; LARG: largura das vilosidades do intestino; ½: metade da largura das vilosidades do intestino; Nº CEL: número de células do fígado.

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05)

O número de células do fígado e a metade da largura, outros parâmetros analisados, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. A falta de resultado para estes parâmetros e para o desempenho zootécnico dos animais pode estar relacionada aos baixos níveis de CE testado. Sendo que, como demonstrado nas análises morfométricas, o nível de 0,0266% é o valor mínimo a ser utilizado, que irá gerar melhoria na capacidade de absorção da ração pelos animais.

DISCUSSÃO

O presente experimento demonstrou que os juvenis de *Astronotus ocellatus* apresentam certa tendência a melhorar seu desempenho com o uso do complexo enzimático na ração com substituição parcial da farinha de peixes pelo farelo de soja. Esses resultados corroboram com Bock et al. (2007), que avaliaram eficiência da fitase na disponibilização de fósforo dos alimentos. Segundo Oliveira et al. (2007), os complexos enzimáticos, compostos por enzimas com características sinérgicas e aditivas, são eficientes no aproveitamento da energia e proteína dos alimentos, o que pode resultar em melhora no desempenho.

Outros autores relataram situação similar aos resultados obtidos no experimento com juvenis de *A. ocellatus*, onde a inclusão de complexo enzimático, mesmo apresentando melhores índices, resultou em ganho de peso similar aos demais tratamentos (SIGNOR et al., 2010; FURUYA et al., 2004). Nunes et al. (2006), testaram três enzimas isoladas na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo elas amilase, lipase e protease. Estes autores encontraram resultados distintos para cada enzima, sendo que, a suplementação com protease não revelou diferenças significativas nos parâmetros de desempenho. Entretanto, a suplementação com amilase a 0,05% e lipase a 0,20% melhoraram, significativamente, o ganho de peso, conversão alimentar e taxa de crescimento específico para esta espécie.

Gominho-Rosa et al. (2015), ao comparar a digestibilidade da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com o jundiá (*Rhamdia quelen*), submetidos a tratamentos com diferentes fontes nutricionais de origem vegetal, concluíram que a tilápia apresentou um aparato digestivo mais eficaz em aproveitar nutrientes de origem

vegetal que o jundiá, uma espécie onívora, porém com trato digestivo curto comparado ao da tilápia. Segundo Rodrigues et al. (2012), o coeficiente intestinal da tilápia é aproximadamente seis vezes maior que o do jundiá (6,26 versus 1,04). Gominho-Rosa et al. (2015), também relataram que a amilase específica do jundiá aumentou significativamente em relação a tilápia, exceto para farelo de trigo, único alimento em que a digestibilidade da tilápia não foi superior à do jundiá. Estes resultados indicam que quando há dificuldade na digestão do alimento, há por consequência, um aumento na produção das enzimas responsáveis pela digestão deste alimento. O *A. ocellatus* é uma espécie que apresenta trato intestinal relativamente curto, portanto, os baixos níveis de complexo enzimático testados podem ter sido causadores da falta de resultado nos valores de desempenho zootécnico.

O tratamento com 0,0266% de adição de complexo enzimático na ração foi o que apresentou melhores resultados para as análises morfométricas. Segundo Gisbert et al. (2008), os aspectos da organização histológica do trato digestório dos peixes sob diferentes condições alimentares são valiosos biomarcadores.

O trato gastrointestinal apresenta uma alta variabilidade na estrutura de acordo com a dieta (BUDDINGTON et al., 1997). É comumente enfatizado que as espécies de peixes herbívoros e detritívoro tendem a ter intestinos mais longos, mais finos e mais estreitos do que os carnívoros (FANGE & GROVE, 1979; JÜNGER et al, 1989, FUGI et al, 2001), e o intestino das espécies onívoras têm um comprimento intermediário (WARD-CAMPBELL et al., 2005). Comprimento intestinal e área também podem ser afetados pelos hábitos alimentares (BUDDINGTON et al., 1997).

CONCLUSÃO

O tratamento com complexo enzimático em dietas para juvenis de *Astronotus ocellatus* não interferiu no desempenho dos peixes. Entretanto, houve uma tendência positiva ao aumentar os níveis de complexo enzimático, além de uma resposta positiva nos parâmetros morfométricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEZERRA e SILVA, J.W.; REGIS, R.C.; BEZERRA, A.T. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, n. 1-2, p. 22-26, 1993.
- BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A. et al. Fitase em rações para tilápia do Nilo na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1455-1461, 2007.
- BUDDINGTON, R.K.; KROGDHAL, Å; BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, Suppl. 638, p. 67-80, 1997.
- COSTA, F.G.P.; CLEMENTINO, R.H.; JÁCOME, I.M.T.D. et al. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.2, p.63-71, 2004.
- FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.
- FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F.H. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 85-99. 1983.
- FURUYA, W.M.; NEVES, P.R.; SILVA, L.C.R. et al. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão de sexo. **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.299-303, 2004.
- GISBERT, E.; GIMÉNEZ, G.; FERNÁNDEZ, L.; KOTZAMANIS, Y.; ESTÉVEZ, A. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. **Aquaculture**, v. 287, p. 381-387, 2009.
- GISBERT, E.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; SARASQUETE, C. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. **Journal of Histology & Histopathology**, v. 23, n. 12, p. 1525-1539, 2008.
- GOMINHO-ROSA, M. C.; RODRIGUES, A. P. O.; MATTIONI, B.; FRANCISCO, A.; MORAES, G.; FRACALLOSSI, D. M.. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p.92-99, jan. 2015.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 181 – 201, 2001.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: Fernando Kubitza, 289p. 2000.

NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M. et al. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

OLIVEIRA, G.R.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F. et al. Digestibilidade de nutrientes em rações com complexo multienzimático para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1945-1952, 2007.

OUHIDA, I.; PEREZ, J.F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1933-1938, 2002.

RODRIGUES, A.P.O., GOMINHO-ROSA, M.D.C., CARGNIN-FERREIRA, E., DE FRANCISCO, A., FRACALOSI, D.M. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquac. Nutr.** 18, 65–72. 2012.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JUNIOR, M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 98-105, 2007.

6 ARTIGO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ENZIMAS EXÓGENAS NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA FARINHA DE PEIXES POR FARELO DE SOJA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE LARVAS DE *Oreochromis niloticus*

RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe da família *Cichlidae*. No Brasil apenas seu cultivo representa metade da produção anual de peixes. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de complexo enzimático em uma ração com substituição de 20% da farinha de peixes por farelo de soja, na alimentação de larvas de *Oreochromis niloticus*. Foram testados cinco tratamentos com quatro repetições cada, a saber: um tratamento controle (sem adição de complexo enzimático), e níveis crescentes de CE: 0,066%; 0,0132%; 0,0200%; e 0,0266%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia no período de 30 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho analisados. Para os parâmetros morfométricos, o tratamento com 0,0200% de complexo enzimático apresentou a melhor resposta para altura das vilosidades. Como conclusão, a inclusão de complexo enzimático não apresentou diferença nos resultados de desempenho, mas houve uma melhora significativa na morfometria dos animais.

Palavras-chave: Nutrição, Piscicultura, Ciclídeos

EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH EXOGENOUS ENZYMES IN THE PARTIAL REPLACEMENT OF FISHMEAL BY SOYBEAN MEAL IN THE ZOOTHECNICAL PERFORMANCE OF *Oreochromis niloticus* LARVAE

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a species of fish in the *Cichlidae* family. In Brazil, its cultivation alone represents half of the annual fish production. The objective of this work was to evaluate the effect of the inclusion of different levels of enzyme complex in a diet with substitution of 20% of fishmeal per soybean meal in the feeding of *Oreochromis niloticus* larvae. Five treatments with four replicates were tested, namely: a control treatment (without addition of enzymatic complex), and increasing levels of EC: 0.066%; 0.0132%; 0.0200%; and 0.0266%. The animals

were fed four times a day within 30 days. There was no significant difference between the treatments for the performance parameters analyzed. For the morphometric parameters, treatment with 0.0200% of enzyme complex presented the best response for villus height. In conclusion, the inclusion of enzyme complex showed no difference in the performance results, but there was a significant improvement in the morphometry of the animals.

Key-words: Nutrition, Fish farming, Ciclídeos

INTRODUÇÃO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixes da família *Cichlidae*. No Brasil, apenas seu cultivo representa metade da produção anual de peixes. Esse destaque se deve a sua resistência a níveis baixos de oxigênio dissolvido e altos de amônia na água, crescimento rápido, boa conversão alimentar e boa aceitação de alimentos artificiais desde a fase larval (MEURER et al., 2000).

Na área da nutrição animal, as pesquisas têm sido realizadas visando alternativas na formulação da dieta, de modo a desenvolver rações mais eficientes e economicamente viáveis, visto que a ração na piscicultura representa a maior parcela no custo total de produção.

Os grãos de soja possuem quantidades elevadas de substâncias pécticas na parede celular (COSTA et AL., 2004). Segundo Ouhida et al. (2002), o tratamento de cascas e cotilédones de soja com enzimas degradadoras de parede celular (pectinase) resulta na liberação de, pelo menos, 7% dos monossacarídeos componentes das frações não solúveis em água.

Os complexos enzimáticos não apresentam função nutricional direta, mas, atuam como auxiliador no processo digestivo, de modo a melhorar a digestibilidade dos nutrientes. A atuação das enzimas exógenas ocorre da mesma forma que as enzimas endógenas, apresentando um sítio ativo com a capacidade de atuar sobre substratos específicos, hidrolisando-os (COSTA et al, 2004).

O uso de subprodutos vegetais na alimentação de peixes é economicamente viável devido sua ampla disponibilidade e, conseqüentemente, menor custo. Os usos de enzimas exógenas nas rações de peixes são excelentes alternativas para

melhora a digestibilidade do farelo de soja e reduzir os custos com farinha de peixes.

Estudos com suplementação de enzimas exógenas em larvas e juvenis de peixes têm apresentado resultados distintos em relação a sua eficiência. Kolkovski (2001) concluiu que o efeito das enzimas digestivas nas dietas é dependente da idade, espécie e do tipo de enzima digestiva, bem como, do hábito alimentar da espécie. O efeito da adição de enzimas digestivas na ração tem sido estudado para algumas espécies de peixes continentais, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (TESSER et al., 2006) e tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (SIGNOR et al., 2010).

Aspectos da organização histológica do trato digestório de peixes sob diferentes condições alimentares podem ser considerados como valioso biomarcador para acessar as condições nutricionais e avaliar o efeito de dietas desbalanceadas em larvas e juvenis (GISBERT et al., 2008). Nesse sentido, Treviño et al. (2011) relataram que o intestino e o fígado são considerados bons alvos de estudo, já que suas organizações histológicas são particularmente sensíveis à quantidade e a qualidade da dieta.

O presente trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar o melhor nível de inclusão e o efeito da incorporação de um complexo multienzimático em uma ração com substituição parcial da farinha de peixe pelo farelo de soja, no desempenho e morfologia do aparelho digestivo de larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Ambiente experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioensaios em Aquicultura Intensiva da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes-RJ. O processamento do material foi realizado no Laboratório de Zootecnia (LZO) situado no Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária (CCTA) e no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Os animais utilizados no experimento foram adquiridos junto a produtores de Piúma. Ao início do experimento os animais foram distribuídos nos aquários na densidade de 10 animais por aquário.

A unidade experimental utilizada foi um aquário de vidro, com volume útil de 20 litros. Os aquários foram acoplados a um sistema de recirculação de água composto de filtro mecânico e biológico, além de um aquário de retorno composto de bomba subaquática com capacidade nominal de 4000 litros por hora, termostato e lâmpada ultravioleta.

Ao início do experimento, devido ao uso de animais ainda em estágio larval (7 dias após a eclosão), foi utilizado um grupo de 15 larvas para realização da biometria inicial. Os peixes apresentaram valores iniciais de comprimento total e peso de 15,84 mm e 0,0583 g, respectivamente.

A qualidade da água do sistema foi monitorada diariamente através de mensuração de pH, oxigênio dissolvido e temperatura. Para evitar variações nestes parâmetros foi feita limpeza dos aquários com troca de água parcial diariamente, evitando-se assim sobrecarga de matéria orgânica no sistema e quando necessário o pH foi reajustado com uso de calcário.

Desenho experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições totalizando 20 unidades experimentais, a saber:

- T1 - Ração controle (sem adição de complexo enzimático);
- T2 - Ração com adição de 0,0066% de complexo enzimático;
- T3 - Ração com adição de 0,0132% de complexo enzimático;
- T4 - Ração com adição de 0,0200% de complexo enzimático;
- T5 – Ração com adição de 0,0266% de complexo enzimático;

Os animais foram alimentados *ad libitum*, quatro vezes ao dia, nos horários de 9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 horas. O foto-período foi controlado artificialmente, com um total de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, sendo que, as luzes se acendiam às 7h e se apagavam as 21h.

O complexo enzimático utilizado foi o Allzyme® SSF; este contém uma fórmula única do produto da fermentação do *Aspergillus niger*. Sua composição é representada por: fitase (300 SPU/g), protease (700 HUT/g), celulase (40 CMCU/g), xilanase (100XU/g), betaglucanase (200 BGU/g), amilase (30 FAU/g) e pectinase (4000 AJDM/g).

As rações experimentais foram elaboradas com o auxílio do programa computacional Super Crac®. Para a confecção das rações foram utilizados ingredientes tradicionais como farinha de peixe, farelo de soja, farelo de milho, óleo de soja, além de premix mineral-vitamínico (Tabela 1). Os alimentos foram moídos e homogeneizados em misturador tipo “Y”. Em seguida, o premix mineral-vitamínico, o óleo de soja e o complexo enzimático foram adicionados e misturados aos alimentos. A peletização foi feita através de peletizadora com umedecimento prévio da mistura com água a 50°C. Após o processamento, os peletes foram secos em estufa (55°C) de ventilação forçada por 24 horas e desintegrados de modo a apresentarem granulometria adequada ao tamanho da boca dos animais. As rações foram identificadas e armazenadas em recipientes plásticos à temperatura ambiente até o início do experimento.

Tabela 1: Composição base das rações experimentais.

Ingrediente	Quantidade (%)
Peixe farinha 55%	53,9772
Soja farelo 45%	20,0000
Milho grão	17,0154
Óleo de soja	6,0074
Vitcre-peixe	2,0000
Fosfato bicalcico	1,0000
Total	100
Composição calculada	
Cálcio %	3,5881
Fosforo total %	2,3896
Met. + cistina total %	1,5638
Metionina total %	1,0064
Fibra Bruta %	1,8936
Ener. Dig. Peixe Mkal/kg	2,8000
Proteína Bruta %	40

Biometria

Ao término do experimento foi feita biometria dos animais para obtenção do comprimento total, comprimento padrão, altura e peso. Antes da biometria os animais foram submetidos à eutanásia por choque térmico em água a 0°C, e posteriormente à aferição dos dados foi realizada dissecação e fixação dos órgãos alvo (intestino e fígado). Foi utilizada formalina neutra tamponada a 10% como fixador dos tecidos.

A partir dos dados biométricos foram encontrados os seguintes parâmetros:

- Ganho de peso (GP)= Peso final – Peso inicial
- Taxa de crescimento específico (TCE)%= $[(\ln \text{ Peso final} - \ln \text{ Peso inicial})/\text{tempo}] \times 100$
- Conversão alimentar (CA)= Alimento ingerido (g)/ganho de peso úmido (g)
- Índice hepatossomático (HSI)= (peso do fígado/peso do corpo todo) x 100
- Índice digestossomático (DSI)= (peso do trato digestivo/peso do corpo todo) x 100

Para avaliação do efeito dos tratamentos, após a biometria final, os animais foram submetidos a análise morfológica do trato digestório (histologia).

Análises histológicas

A partir desta análise foram confeccionadas as lâminas permanentes coradas em hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica. Todas as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF.

Todos os tecidos coletados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e imediatamente fixados. Cada amostra foi fixada por um período mínimo de 24 horas.

A seguir as amostras foram clivadas, se necessário, e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica® TP1020), onde foram desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. A seguir foi procedida à clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em sequência, o material foi incluído no próprio histossete em que foi acondicionado, técnicas especiais poderão ser empregadas se necessários.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de cinco micrômetros de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145). Os cortes foram colocados em banheira histológica, de onde foram coletados com lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica.

As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital Infinity1® e software Infinity Analyze®, adaptada em microscópio óptico (Nikon® ECLIPSE E2000).

Análises estatísticas

Os dados das variáveis obtidos foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância e, em caso de diferenças, foi aplicado o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico SAS 9.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, os valores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura foram mensurados diariamente, com valores respectivos de $6,39 \pm 0,57$, $6,25 \pm 0,75$ mg/l, $28,9 \pm 0,84$ °C. Os valores registrados se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos para peixes tropicais (KUBITZA, 2000).

A suplementação do complexo enzimático nas rações com substituição parcial da farinha de peixe pelo farelo de soja, não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) nos fatores de desempenho em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Tabela 2).

Tabela 2: Comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), altura (H), peso (P), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) de *Oreochromis niloticus*.

Níveis de enzima	CT (mm)	CP (mm)	H (mm)	P (g)	GP (g)	TCE
0	50,99 ^a	40,26 ^a	17,21 ^a	3,20 ^a	3,14 ^a	13,04 ^a
0,0066	50,21 ^a	39,35 ^a	17,32 ^a	3,19 ^a	3,13 ^a	12,07 ^a
0,0132	50,77 ^a	40,01 ^a	17,62 ^a	3,39 ^a	3,33 ^a	13,15 ^a
0,0200	50,41 ^a	39,26 ^a	17,30 ^a	3,20 ^a	3,15 ^a	13,04 ^a
0,0266	50,73 ^a	40,25 ^a	17,36 ^a	3,27 ^a	3,22 ^a	12,96 ^a
CV (%)	4,85	4,69	4,26	10,27	10,46	2,87

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05)

O tratamento que recebeu 0,0132% de complexo enzimático (CE) apresentou valores mais altos para peso, ganho de peso e taxa de crescimento específico, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05).

O tratamento com inclusão de 0,0066% de CE foi o único que não apresentou valor superior em ganho de peso em relação ao tratamento controle. Segundo Oliveira et al. (2007), os complexos enzimáticos, compostos por enzimas com características sinérgicas e aditivas, são eficientes no aproveitamento da energia e proteína dos alimentos. Os resultados corroboram com Bock et al. (2007), que avaliaram eficiência da fitase na disponibilização de fósforo dos alimentos. Há relatos de outros autores que testaram enzimas exógenas para peixes e também não encontraram diferença significativa nos valores de peso final, comprimento final e sobrevivência (Furuya et al., 2004).

Nunes et al. (2006), testaram três enzimas isoladas na dieta de tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo elas amilase, lipase e protease. Estes autores encontraram resultados distintos para cada enzima, sendo que, a suplementação com protease não revelou diferenças significativas nos parâmetros de desempenho. Entretanto, a suplementação com amilase a 0,05% e lipase a 0,20% melhoraram, significativamente, o ganho de peso, conversão alimentar e taxa de crescimento específico para esta espécie.

O consumo de ração apresentou valores mais baixos nos tratamentos que receberam complexo enzimático em sua formulação. Entretanto, não foi registrada

diferença significativa ($P>0,05$). A conversão alimentar e sobrevivência também não diferiram significativamente entre os tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 3). Resultado similar foi encontrado por outros autores (SIGNOR et al., 2010), cujos níveis de 0,066% e 0,099% de complexo enzimático nas rações de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) resultaram em menor consumo alimentar e melhor conversão alimentar, apesar do ganho de peso similar. Estes autores relataram que o nível de 0,066% de CE disponibilizou maior quantidade de nutrientes, levando os peixes ao menor consumo de ração.

Tabela 3: Comprimento do intestino (Ci), índice hepatossomático (IHS), índice digestossomático (IDS), consumo de ração por peixe (CrPX), conversão alimentar (CAA), sobrevivência (SB%) de *Oreochromis niloticus*.

Níveis de enzima	Ci (mm)	IHS	IDS	CrPX (g)	CAA	SB%
0	260,1 ^a	2,71 ^a	8,58 ^a	3,19 ^a	0,99 ^a	85,00 ^a
0,0066	275,5 ^a	2,11 ^a	8,42 ^a	2,98 ^a	1,05 ^a	95,00 ^a
0,0132	301,5 ^a	2,16 ^a	9,32 ^a	3,01 ^a	1,10 ^a	95,00 ^a
0,0200	276,6 ^a	2,37 ^a	8,21 ^a	2,97 ^a	1,05 ^a	90,00 ^a
0,0266	273,6 ^a	2,33 ^a	9,15 ^a	2,66 ^a	1,31 ^a	87,50 ^a
CV (%)	160,9	35,21	11,16	12,16	20,40	9,78

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey($P<0,05$)

Os valores médios de consumo de ração, conversão alimentar e taxa de crescimento específico, que apresentaram melhores índices nos tratamentos que receberam 0,0132%, 0,0200% e 0,0266%, podem indicar que a inclusão de complexo enzimático disponibilizou maior quantidade de nutrientes, levando os peixes a menor consumo, apesar de não haver registro significativo ($P>0,05$) nos parâmetros zootécnicos. Há registros similares na literatura, cuja inclusão de complexos enzimáticos, mesmo apresentando melhores índices, resultou em ganho de peso similar aos demais tratamentos (SIGNOR et al., 2010).

Na literatura são encontrados trabalhos com utilização de enzimas exógenas de forma isolada (MOURA et al., 2007; NUNES et al., 2006; FURUYA et al., 2001; GONÇALVEZ et al., 2004; BOCK et al., 2007) ou na forma de complexos (SIGNOR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2007), que relatam seus efeitos na nutrição de

diferentes espécies de peixes. Entretanto, não há relato de malefícios da utilização dessas enzimas na digestibilidade e nem no crescimento das espécies avaliadas.

Nos resultados encontrados no presente trabalho, não houve uma tendência significativa para os parâmetros de desempenho zootécnico, ou seja, os níveis de CE testados não apresentaram uma tendência em melhorar o desempenho dos peixes para a ração utilizada. A tilápia é uma espécie onívora com aparato digestivo bem desenvolvido, capaz de obter bom aproveitamento de nutrientes de origem vegetal (GOMINHO-ROSA et al., 2015). Meurer et al. (2000), observaram em seu trabalho que essa espécie, quando submetidas a tratamentos com aumentos dos níveis de soja na ração, apresentam efeito linear positivo sobre os valores de peso e comprimentos finais médios. Portanto, a espécie, mesmo sem a adição de CE, apresenta boa capacidade de aproveitar o farelo de soja na ração em substituição a farinha de peixe. Esta pode ser uma explicação para a variação dos resultados encontrados no presente experimento.

O resultado das análises morfométricas para os parâmetros de largura da vilosidade, metade da largura da vilosidade e número de células do fígado não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4). Entretanto, para o parâmetro de altura da vilosidade o tratamento com adição de 0,0200% de CE foi melhor significativamente ($P < 0,05$) que os demais tratamentos.

Tabela 4. Resultado dos parâmetros morfométricos.

Níveis de enzima	ALT (μm)	LARG (μm)	$\frac{1}{2}$ (μm)	Nº CEL
0	192,74 ^b	58,99 ^a	32,25 ^a	213,50 ^a
0,0066	196,61 ^b	73,67 ^a	39,71 ^a	243,50 ^a
0,0132	210,10 ^b	70,57 ^a	35,76 ^a	275,50 ^a
0,0200	272,97 ^a	75,58 ^a	40,42 ^a	238,00 ^a
0,0266	221,55 ^b	68,46 ^a	37,22 ^a	243,50 ^a
CV (%)	7,98	11,26	19,43	22,55

ALT: altura das vilosidades do intestino; LARG: largura das vilosidades do intestino; $\frac{1}{2}$: metade da largura das vilosidades do intestino; Nº CEL: número de células do fígado.

Médias seguidas por letras diferente, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Aspectos da organização histológica do trato digestório durante a ontogenia inicial ou sob diferentes condições alimentares podem ser considerados como valioso biomarcadores para acessar as condições nutricionais e avaliar o efeito de dietas desbalanceadas em larvas e juvenis (GISBERT et al., 2008). Segundo Segner et al., (1994), as mudanças nutricionais ou as dietas nutricionalmente deficientes são fatores que afetam sensivelmente as reservas energéticas e hepáticas.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie tipicamente onívora, com baixo pH estomacal, um intestino com um coeficiente intestinal médio de 6,14 e uma ampla distribuição de enzimas ao longo do intestino (RODRIGUES et al., 2012; RUST et al., 2002; TENGJAROENKUL et al., 2000).

A mudança de farinha de peixes e óleo de peixe para produtos de soja apresenta vários desafios metabólicos e de saúde para os peixes cultivados. Ao usar altos níveis dietéticos de materiais derivados de plantas, particularmente aquele derivado da soja é importante considerar os impactos na microbiota intestinal e na histologia intestinal, pois o trato gastrointestinal (GI) pode ser uma das importantes rotas de infecção para alguns patógenos em peixes (MERRIFIELD et al., 2011).

Foi considerado por Gisbert et al., (2004), que o achatamento progressivo das vilosidades intestinais em larvas de *Paralichthys californicus* é característico de larvas em jejum progressivo. Por outro lado, segundo as observações de Tesser et al., (2006), a presença de núcleo dos hepatócitos excêntricos, são consequência da grande quantidade de reserva e, principalmente, da presença de glicogênio, evidenciada pela forte reação positiva ao PAS observada em seu trabalho.

Kolkovski et al. (1997) e Kolkovski et al. (2000), em estudo com larvas de *Dicentrarchus labrax* e *Perca flavensis*, respectivamente, não encontraram efeito significativo da suplementação de enzimas exógenas sobre o crescimento e a sobrevivência dos animais, sugerindo que a quantidade de enzimas ativas provenientes da dieta não foi suficiente para promover efeito sobre o desempenho produtivo. Outra possibilidade avaliada pelos autores seria a de que essas espécies não respondem a suplementação de enzimas exógenas. Por outro lado, a adoção de enzimas em dietas pode acarretar pré-hidrólise dos seus componentes antes mesmo do oferecimento aos peixes (DABROWSKA et al., 1979). Esse fato foi confirmado recentemente por Stone et al. (2003), que notaram aumento na

quantidade de açúcares na dieta suplementada em comparação àquela sem suplementação. As teorias expostas pelos autores podem explicar a ausência de resultados significativos no presente trabalho. Além disso, o fato da tilápia apresentar aparato digestório bem desenvolvido, ou seja, apropriado para digestão de alimentos de origem vegetal, é outro fator a se considerar.

O tratamento com complexo enzimático em dietas para larvas de *Oreochromis niloticus* não interfere no desempenho dos peixes. Dentre os parâmetros morfométricos analisados, o nível de 0,0200% apresentou resultado positivo na altura da vilosidade, o que indica benefícios no uso do complexo enzimático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZERRA e SILVA, J.W.; REGIS, R.C.; BEZERRA, A.T. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, n. 1-2, p. 22-26, 1993.

BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A. et al. Fitase em rações para tilápia do Nilo na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1455-1461, 2007.

BUDDINGTON, R.K.; KROGDAHAL, Å; BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, Suppl. 638, p. 67-80, 1997.

COSTA, F.G.P.; CLEMENTINO, R.H.; JÁCOME, I.M.T.D. et al. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.2, p.63-71, 2004.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.

FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F.H. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 85-99. 1983.

FURUYA, W.M.; NEVES, P.R.; SILVA, L.C.R. et al. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão de sexo. **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.299-303, 2004.

GISBERT, E.; GIMÉNEZ, G.; FERNÁNDEZ, L.; KOTZAMANIS, Y.; ESTÉVEZ, A. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. **Aquaculture**, v. 287, p. 381-387, 2009.

GISBERT, E.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; SARASQUETE, C. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. **Journal of Histology & Histopathology**, v. 23, n. 12, p. 1525-1539, 2008.

GISBERT, E.; CONKLIN, D.B.; PIEDRAHITA, R.H. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.116-132, 2004.

GOMINHO-ROSA, M. C.; RODRIGUES, A. P. O.; MATTIONI, B.; FRANCISCO, A.; MORAES, G.; FRACALOSSO, D. M.. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p.92-99, jan. 2015.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 181 – 201, 2001.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiá: Fernando Kubitza, 289p. 2000.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, W. R. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 2, p. 479-484, June 2000.

NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M. et al. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

OLIVEIRA, G.R.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F. et al. Digestibilidade de nutrientes em rações com complexo multienzimático para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1945-1952, 2007.

OUHIDA, I.; PEREZ, J.F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1933-1938, 2002.

RODRIGUES, A.P.O., GOMINHO-ROSA, M.D.C., CARGNIN-FERREIRA, E., DE FRANCISCO, A., FRACALOSSO, D.M. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquac. Nutr.** 18, 65–72. 2012.

RUST, M.B. Nutritional physiology, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), **Fish Nutrition**, 3rd edition Academic Press, California, pp. 393–412. 2002.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com

rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

TENGJAROENKUL, B., SMITH, B.J., CACECI, T., SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture** 182, 317–327. 2000.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JUNIOR, M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 98-105, 2007.